



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<b>(51) 国際特許分類6</b> C12N 15/12, C07K 14/47, C12N 5/16, C12P 21/02	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO99/50412</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 1999年10月7日(07.10.99)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP99/01512  <b>(22) 国際出願日</b> 1999年3月24日(24.03.99)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平10/100467 1998年3月27日(27.03.98) JP  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒101-0048 東京都千代田区神田司町2丁目9番地 Tokyo, (JP) <b>(71) 出願人 ; および</b> <b>(72) 発明者</b> 井川洋二(IKAWA, Yoji)[JP/JP] 〒146-0091 東京都大田区鶴の木3-31-8 Tokyo, (JP) <b>(72) 発明者 ; および</b> <b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b> 井川俊太郎(IKAWA, Shuntaro)[JP/JP] 〒982-0826 宮城県仙台市太白区三神峯1-3-4-301 Miyagi, (JP) 帯刀益夫(OBINATA, Masuo)[JP/JP] 〒980-0871 宮城県仙台市青葉区八幡5-3-10-402 Miyagi, (JP)		<b>(74) 代理人</b> 弁理士 三枝英二, 外(SAEGUSA, Eiji et al.) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka, (JP)  <b>(81) 指定国</b> CA, CN, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)  <b>添付公開書類</b> 国際調査報告書
<b>(54) Title: HUMAN p51 GENES AND GENE PRODUCTS THEREOF</b>  <b>(54) 発明の名称</b> ヒトp51遺伝子及びその遺伝子産物  <b>(57) Abstract</b> Novel human genes falling within the category of family genes relating to p53 gene which is known as a cell proliferation regulatory gene, and gene products thereof. A human p51 gene characterized by containing a base sequence encoding an amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1; a human p51 gene having a base sequence consisting of the 145- to 1488-bases in the sequence represented by SEQ ID NO:2; vectors containing these genes; host cells transformed with these vectors; a process for producing a p51 protein having the amino sequence represented by SEQ ID NO:1 which comprises culturing the above host cells and harvesting the protein from the thus obtained culture; and the p51 protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1.		

本発明は、細胞増殖抑制遺伝子として知られている p 5 3 遺伝子に関連するファミリー遺伝子に含まれる、新規なヒト遺伝子及びその遺伝子産物を提供することを目的とする。本発明は、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むことを特徴とするヒト p 5 1 遺伝子、配列番号 2 において塩基番号 145～1488 に示される塩基配列を有するヒト p 5 1 遺伝子、該遺伝子を有するベクター、該ベクターで形質転換してなる宿主細胞、該宿主細胞を培養し、得られる培養物から蛋白質を回収する配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有する p 5 1 蛋白の製造法、並びに配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有する p 5 1 蛋白。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア			TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

## 明 細 書

### ヒト p 5 1 遺伝子及びその遺伝子産物

#### 技術分野

5       本発明は、新規ヒト遺伝子に関する。より詳細には、癌抑制遺伝子として知られている、ヒト p 5 3 遺伝子及びヒト p 7 3 遺伝子と類似性を有する新規なヒト遺伝子及びその遺伝子産物に関する。

10

#### 背景技術

p 5 3 蛋白は D N A 型腫瘍ウイルス S V 4 0 の大型 T 抗原と結合する核内蛋白として発見され、その遺伝子 ( p 5 3 遺伝子 ) がクローニングされている。当初 p 5 3 遺伝子は、ras 遺伝子と共に細胞に導入することによって胚  
15 由来細胞がトランスフォームされることから、癌遺伝子と考えられていた。しかしその後の研究により当初得られた p 5 3 遺伝子のクローンは変異型であり、野生型はむしろ変異型のトランスフォーム能を抑制することが明らかになった。今では p 5 3 遺伝子の欠失若しくは異常  
20 が多くのヒトの癌において検出されており、また高発癌性遺伝病として知られる Li-Fraumeni 症候群において p 5 3 遺伝子の配偶子変異が発見されたこと等から、p 5 3

遺伝子は重要な癌抑制遺伝子と考えられるに至っている  
[Baker, S. J., et al., Science, 244, 217-221 (1989): Nigro, J. M., Nature, 342, 705-708 (1989)]。

ヒト p 5 3 蛋白は、3 9 3 個のアミノ酸からなり、大  
5 きく N 末端ドメイン(1~101番目のアミノ酸領域)、コア  
ドメイン(102~292番目のアミノ酸領域)、及び C 末端ド  
メイン(293~393番目のアミノ酸領域)の 3 領域に分けら  
れる。N 末端ドメインは、酸性アミノ酸や高プロリン領  
域などの転写制御に必要な領域を含んでおり、転写活性  
10 化ドメインであると考えられる。中央のコアドメインは、  
3 カ所の疎水性部位を含んでおり、塩基配列に特異的な  
D N A 結合に関与するドメインである。また C 末端ドメ  
インは、多くの塩基性アミノ酸及び四量体形成に必要な  
領域を含んでおり、非特異的 D N A 結合や D N A 損傷の  
15 認識並びにトランスフォーム抑制などの役目を担ってい  
ると考えられている。

ヒト癌細胞に検出される p 5 3 遺伝子の異常の多くが  
ミスセンス変異で、その殆どが N 末端から 1 0 0 ~ 3 0  
0 アミノ酸の部位に相当するコアドメイン、特に種を越  
20 えて保存されたホット・スポット (Hot Spot) と称され  
る領域に集中している。かかるコアドメイン中のホット  
・スポット領域は p 5 3 蛋白と D N A との結合に関与す



る領域であり、実際、当該領域の変異によってDNAとの特異的結合が障害される。

5 以上のことから、p53蛋白は、他の遺伝子に特異的に結合して当該遺伝子の発現を調節する転写制御因子としての役割をもつことが明らかとなった。

p53蛋白によって転写が誘導される遺伝子としては、p21遺伝子〔WAF1或いはCIP1、或いはSDI1と言われる（El-Dairy, W. S., et al., Cell, 75, 817 (1993)）；MDM2（Wu, X., et al., Genes Dev., 7, 1126 (1993)）；MCK（Weintraub, H., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4570 (1991)）；Zambetti, G. P., et al., Genes Dev., 6, 1143 (1992)〕、GADD45〔Kastan, M. B., et al., Cell, 71, 587 (1992)〕、サイクリンG〔Cyclin G: Okamoto, K., EMBO J., 13, 4816 (1994)〕、BAX〔Miyashita, T., et al., Cell, 80, 293 (1995)〕、及びインスリン様成長因子結合蛋白3〔IGF-BP3: Buckbinder, L., et al., Nature, 377, 646 (1995)〕などを例示することができる。

20 p21遺伝子がコードする蛋白質は、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)の阻害蛋白質であり、野生型p53蛋白がp21を介して細胞周期を抑制的に調節することが判明している〔Harper, J. W., et al., Cell, 75, 805 (19

93): Xiong, Y., et al., Nature, 366, 707 (1993): Gu, Y.,  
et al., Nature, 366, 701 (1993)]]。また p 2 1 遺伝子は、  
増殖細胞核抗原 (P C N A) に結合して、直接 D N A の  
複製を抑制することも報告されている [Waga, S., et al.,  
5 Nature, 369, 574 (1994)]。更に p 2 1 遺伝子は、細胞の  
老化を誘導し、D N A 合成を抑制する作用を有する S D  
I 1 遺伝子と同一の遺伝子であることが判明している [N  
oda, A., et al., Exp. Cell Res., 211, 90 (1994)]。

M D M 2 は、p 5 3 蛋白に結合して該蛋白の転写制御  
10 活性を不活性化することから、負のフィードバック調節  
因子として作用していると推測されている。

I G F - B P 3 は I G F シグナル化の負の調節因子で  
ある。このため p 5 3 蛋白による I G F - B P 3 遺伝子  
の増加は、結果として、p 5 3 蛋白が I G F 依存性細胞  
15 の成長抑制を導く可能性を示唆する。

また、野生型 p 5 3 蛋白は、骨髓性白血病性細胞のア  
ポトーシスを誘導することが報告されている [Yonish-R  
ouach, E., et al., Nature, 352, 345 (1991)]。放射線照射  
による胸腺細胞アポトーシスの誘導は p 5 3 欠損マウス  
20 には起こらず [Lowe, S. W., Nature, 362, 847 (1993): Cla  
rke, A. R., et al., Nature, 362, 849 (1993)]、また p 5 3  
蛋白は、水晶体、網膜、脳において正常網膜芽腫遺伝子

(R B 遺伝子) 活性を失っている細胞のアポプティックな死を誘導する [Pan, H., and Griep, A. E., Genes Dev., 8, 1285 (1994); Morgenbesser, S. D., et al., Nature, 371, 72 (1994); Howes, K. A., Genes Dev., 8, 1300 (1994); Symonds, H., et al., Cell, 78, 703 (1994)]。ホワイ ト氏は、p 5 3 蛋白は R B 遺伝子変異の探索に有用であり、また R B 遺伝子変異を含む細胞のアポトーシスを誘導するだろうと提言している [White, E., Nature, 371, 21 (1994)]。

10      また、温度感受性を持つ p 5 3 遺伝子のみが発現しているマウス赤芽球性白血病細胞系では温度の下降で変異 p 5 3 遺伝子が野生型に戻り、アポトーシスを誘導し、そこから取り出した変異 p 5 3 遺伝子を p 5 3 欠損線維芽細胞系が軟寒天培地内で増殖できる能力を付与する (anchorage-independencyを与える) [Xu et al., Jpn. J. Cancer Res. 86:284-291 (1995); Kato et al., Int. J. Oncol. 9:269-277]。

20      B A X はアポトーシスの抑制因子である b c l - 2 に結合することができ、アポプティックな細胞死を促進する [Oltvai, Z. M., et al., Cell, 74, 609 (1993)]。p 5 3 蛋白による B A X 遺伝子の増加と b c l - 2 の減少は、マウス白血病細胞株 M 1 のアポトーシスに関連しており

[Miyashita, T., et al., Oncogene, 9, 1799 (1994)]、またアポトーシスに対するシグナル・トランスデューサーの一つである Fas が、非小細胞肺癌と赤白血病において増加しているという報告がある [Owen-Schaub, L. B., et al., Mol. Cell Biol., 15, 3032 (1995)]。

以上述べてきたような多くの研究により、p 5 3 蛋白は p 2 1 遺伝子に限らず様々の遺伝子の転写を亢進或いは抑制することが明らかになってきている。また、転写調節機能が欠落した変異型 p 5 3 蛋白においても、細胞内の他の蛋白質と相互作用してシグナルを伝達する能力や DNA の損傷修復機能があることが示されている。

今までわかっている p 5 3 蛋白の機能としては、例えば、転写調節機能、他の細胞内蛋白質と結合することによるシグナル伝達機能、DNA 複製に関する蛋白質複合体の構成要素、DNA 結合能、エキソヌクレアーゼ活性が挙げられ、これらの機能が複合的に作用する結果、細胞の細胞周期停止、アポトーシス誘導、DNA 修復、DNA 複製調節及び分化誘導を引き起こすものと考えられる。

さらに p 5 3 蛋白の機能は、遺伝子に損傷が生じたときのみ働くわけではなく、例えばウイルス感染、サイトカイン刺激、低酸素状態、ヌクレオチドプールの変化、

- 薬物による代謝異常等の各種のストレスが生体組織に及ぶと、その刺激を引き金として、p 5 3 蛋白の量的若しくは質的な変化が起こると言われている。量的・質的調節を受けた p 5 3 蛋白は、他の蛋白質との相互作用によるシグナル伝達や他の遺伝子の転写制御などの機能を発現し、生体ストレスを受けた生体組織の細胞の DNA を複製調節したり、細胞周期を停止させて細胞を修復したり、アポトーシスによって細胞を排除したり、或いは細胞の分化を促進したりすることで生体組織をストレスから防御するのに寄与していると考えられている〔Ganman, C.E., et al., Genes Dev., 9, 600-611(1995): Graeber, T.G., et al., Nature, 379, 88-91(1996): Linke, S.P., et al., Genes Dev., 10, 934-947 (1996): Xiang, H., et al., J. Neurosci., 16, 6753-6765 (1996)〕。
- 15 ヒト腫瘍の半数に p 5 3 遺伝子の変異が存在することから、近年腫瘍の診断や治療に対して、p 5 3 遺伝子及びその蛋白の臨床的応用が検討されている。p 5 3 遺伝子の変異部位を特異的に認識するプライマーを用いて P C R を行い、リンパ節や体液中に浸潤した腫瘍細胞を検出する方法は、腫瘍の浸潤範囲或いは再発などを予測するための有効な診断方法となりうる〔Hayashi, H., et al., Lancet, 345, 1257-1259 (1995)〕。
- 20

更に p 5 3 蛋白には、アポトーシス誘導能があることから、ウイルス・ベクターを用いて腫瘍細胞に野生型 p 5 3 遺伝子を導入する遺伝子治療が米国で行われており、その有効性が報告されている [Roth, J. A., et al.,  
5 Nature Med., 2, 985-991 (1996)]。また最近、日本においても数カ所で当該遺伝子治療が開始されている。

その一方で、ヒト腫瘍の半数以上は p 5 3 遺伝子の変異を有しておらず、このことから p 5 3 蛋白に類似する腫瘍形成抑制機能を有する他の蛋白が存在する可能性が  
10 指摘されている。

本発明者らは、先に p 5 3 の遺伝子変異が非ホジキン型悪性リンパ腫 (NHL) の前兆指標にならないことを見出した。

また、近年、上記の p 5 3 遺伝子と高い相同性を有する p 7 3 と命名された新規な遺伝子が確認された [Kaghad, M., et al., Cell, 90, 809-819 (1997)]。上記本発明者らの知見によると、p 7 3 蛋白は、転写活性化ドメイン (1 ~ 4 5 番目のアミノ酸領域) においてヒト p 5 3 蛋白と 2 9 % の相同性を示し、6 つの変異のあるホット・スポットと呼ばれる相補的な保存領域を持つ DNA 結合ドメイン (113 ~ 290 番目のアミノ酸領域) における相同性は  
20 6 3 % で、オリゴメリゼーション領域 (319 ~ 363 番目のア

ミノ酸領域)の相同性は38%である。しかしながら、C末端ドメインに関してはp73蛋白とp53蛋白との間に有意な相同性は認められていない。

p73蛋白の過剰発現によって、神経芽腫細胞株やSAOS2細胞(骨肉腫細胞株)の成長が抑制されること、またp73蛋白の一時的な発現によってSAOS2細胞とベビー・ハムスターの腎細胞のアポトーシスが促進されることが報告されている[Bruce Clurman and Mark Groudine, Nature, 389, 122-123 (1997); Christine, A., et al., Nature, 389, 191-194 (1997)]。

しかしながら、p73蛋白は、正常組織においては低いレベルでしか発現しない点でp53蛋白と少々異なっている。さらに、神経芽腫細胞株におけるp73蛋白の発現は、紫外線照射や低用量のアクチノマイシンDによって誘導されない点においてもp53蛋白と異なっていた。

このようにp73蛋白は、p53蛋白と全く同一の機能を保有するものではなく、今後の更なる研究が待たれているのが現状である。今までの観察から、このp73は神経芽腫における推定的な腫瘍抑制因子として位置づけられるとの報告もある。

本発明は、ヒト腫瘍の形態形成に関連する新たな遺伝

子及びその遺伝子産物に関する情報を提供することを目的とする。より詳細には、本発明は前述するように癌抑制遺伝子として公知の p 5 3 遺伝子と類似性を有する新規な遺伝子並びにその遺伝子産物を提供することを目的とする。

5

更に本発明は、該遺伝子の部分 D N A からなるプライマーやプローブ、該遺伝子を含むベクター、該ベクターが導入された形質転換体、該形質転換体を培養することからなる、上記遺伝子産物の製造方法を提供することを

10 目的とする。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、p 5 1 A 蛋白の構造的なドメインの特徴を、p 5 3 蛋白及び p 7 3  $\beta$  蛋白とともに示した図である。

15 図中、「T A」は転写活性化領域、「DNA binding」は D N A 結合領域、及び「oligo」はオリゴメリゼーション領域をそれぞれ示す。

図 2 は、ヒト p 5 1 A 遺伝子でコードされるアミノ酸配列を p 5 3 蛋白及び p 7 3  $\beta$  蛋白の各アミノ酸配列と比較し、三者間の相同性をみた図である。三者が同一であるアミノ酸を四角で囲んで示す。

20

図 3 は、ヒト p 5 1 B 遺伝子でコードされるアミノ酸



配列を p 7 3  $\alpha$  蛋白の各アミノ酸配列と比較し、両者の相同性をみた図である。両者が同一であるアミノ酸を四角で囲んで示す。

図 4 は、p 5 1 蛋白の alternative splicing variant (p51A、p51B) の構造を、p 7 3 蛋白の alternative splicing variant (p73 $\alpha$ 、p73 $\beta$ ) の構造と模式的に比較した図である。

図 5 は、種々のヒト組織における p 5 1 m R N A 発現状況を、ノーザンブロッティング（クローンテック社のフィルター使用）による電気泳動像で示す図面に代わる写真である。各レーンは、1 : 心臓、2 : 脳、3 : 胎盤、4 : 肺、5 : 肝臓、6 : 骨格筋 7 : 脾臓、8 : 膵臓の結果を示す。

図 6 は、種々のヒト組織における p 5 1 m R N A 発現状況を、ノーザンブロッティング（クローンテック社より購入した R N A を用いて作製したフィルター使用）による電気泳動像で示す図面に代わる写真である。各レーンは、1 : 乳腺 (mammary gland)、2 : 前立腺 (prostate)、3 : 唾液腺 (salivary gland)、4 : 胃 (stomach)、5 : 胸腺 (thymus)、6 : 甲状腺 (thyroid)、7 : 気管 (trachea)、8 : 子宮 (uterus) の結果を示す。

図 7 は、p 5 1 A 遺伝子のコロニー形成抑制能を示す

図面に代わる写真である。具体的には、p 5 1 A 発現プラスミド (p51A)、p 5 3 発現プラスミド (p53)、H A タグの付いた p 5 1 A 発現プラスミド (HAp51A) 及びベクターのみ (RcCMV) で形質転換した各細胞のコロニー形成能を比較した図面に代わる写真である。

図 8 は、実験例 2 に用いたリポーター構築物を模式的に示す図である。図中、WAF-1 promoter luc は、二つの p 5 3 調節エレメントを残している野生型 p 2 1 W A F 1 プロモーター構築物、del 1 は一つの上流エレメントが取り除かれている構築物、及び del 2 は 両エレメントが取り除かれている構築物をそれぞれ示す。

図 9 は、図 8 に示した種々のリポーター構築物を有する各 p 5 1 A 発現プラスミド (p51A)、p 5 3 発現プラスミド (p53) またはコントロール・ベクター (Rc/CMV) を、S A O S 2 細胞に導入した際の transactivation 活性を示す図である (実験例 2 参照)。

図 10 は、p 5 3 応答性が実験的に示されている P G C リポーター構築物を有する各 p 5 1 A 発現プラスミド (p51A)、H A 標識した p 5 1 A 発現プラスミド (HAp51A)、p 5 3 発現プラスミド (p53) またはコントロール・ベクター (RcCMV) を、S A O S 2 細胞に導入した際の transactivation 活性を示す図である (実験例 2 参照)。

図 1 1 は、実験例 4 において、ヒト p 5 1 A 遺伝子を含む 1 C 1 細胞及び 4 B 1 細胞、及び p 5 1 A 遺伝子を含まない 1 - 2 - 3 細胞について、3 2 °C 及び 3 7 °C の異なる温度下で培養した場合の D N A の断片化を調べた結果を示す図面に代わる写真である（アガロース電気泳動のエチジウムブロマイド染色像）。

図中「1 - 2 - 3 細胞」とはベクターだけを導入し、p 5 1 A 遺伝子を含まない対照の細胞であり、「1 C 1 細胞」又は「4 B 1 細胞」とは、p 5 1 A 遺伝子を含む発現ベクター（p R c C M V / p 5 1 A）で形質転換した p 5 1 A 導入 1 - 2 - 3 細胞である。また  $\lambda$  / Hind III は  $\lambda$  ファージ D N A の制限酵素 Hind III による分解物であり、D N A のサイズマーカーである（New England Biolabs. ind. 製）。また、100bp ladder とは 100 b p の整数倍のサイズを有する D N A 断片からなるサイズマーカーである（GIBCO-BRL 製）。

図 1 2 ~ 1 4 は、ヒト p 5 1 B 遺伝子のコード領域の塩基配列（下段）とマウスホモログ（マウス p 5 1 B 遺伝子）の当該配列（上段）とを比較した図面である。なお、両者間で同一の塩基には図中★印を記している。

図 1 5 は、図 1 2 ~ 1 4 で示すヒト p 5 1 B 遺伝子及びマウス p 5 1 B 遺伝子でそれぞれコードされるヒト p

5 1 B 蛋白及びマウス p 5 1 B 蛋白のアミノ酸配列を比較した図面である。なお、両者間で同一のアミノ酸には  
10 図中★印を記している。

5

### 発明の開示

前述するように、ヒト腫瘍組織の半数以上は癌抑制遺伝子である p 5 3 遺伝子の変異体を有していないことから、従来から p 5 3 蛋白以外にも腫瘍形成抑制機能を果たしている遺伝子産物（蛋白）が存在している可能性が  
10 示唆されている。

このため、本発明者らは、かかる腫瘍形成抑制機能に関連する新規遺伝子並びにその遺伝子産物を探索すべく鋭意研究を重ねていたところ、上記 p 5 3 蛋白と同様な活性を有する蛋白をコードするヒト由来の新規遺伝子を見  
15 いだし、該遺伝子又はその遺伝子産物がアポトーシスに有意に関連していることを確認した。本発明はかかる知見に基づくものである。

すなわち、本発明は下記 1 ～ 8 に掲げるヒト p 5 1 遺伝子及びそれに関連する遺伝子である。

20 1. 以下の（a）又は（b）の蛋白質をコードする遺伝子：

（a）配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有する蛋白質

(b) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を有し、且つ p 5 1 活性を有する蛋白質。

5      2. 以下の (a) 又は (b) の DNA を有する遺伝子：

(a) 配列番号 2 に示される塩基配列において、塩基番号 1 4 5 ～ 1 4 8 8 に示される塩基配列からなる DNA

10      (b) 配列番号 2 に示される塩基配列において、塩基番号 1 4 5 ～ 1 4 8 8 に示される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ p 5 1 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

15      3. 配列番号 2 に示される塩基配列を有する上記 2 記載の遺伝子。

4. 以下の (a) 又は (b) の DNA を有する cDNA：

20      (a) 配列番号 2 に示される塩基配列において、塩基番号 1 4 5 ～ 1 4 8 8 に示される塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号 2 に示される塩基配列において、塩基番号 1 4 5 ～ 1 4 8 8 に示される塩基配列から

なる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ p 5 1 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

5 5 . 配列番号 2 に示される塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることを特徴とする DNA。

6 . 配列番号 2 の塩基番号 1 4 5 ~ 1 4 8 8 に示される塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることを特徴とする DNA。

10 7 . プライマーとして用いられる上記 5 記載の DNA。

8 . プローブとして用いられる上記 5 記載の DNA。

さらに本発明は、下記 9 ~ 1 4 に掲げるヒト p 5 1 蛋白及びそれに関連する蛋白質若しくは（ポリ）ペプチドである。

15 9 . 以下の（a）又は（b）に示す蛋白質：

（a）配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有する蛋白質

（b）配列番号 1 に示すアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を有し、且つ p 5 1 活性を有する蛋白質。

20

1 0 . 配列番号 1 において、少なくともアミノ酸番号 1 ~ 5 9、アミノ酸番号 1 4 2 ~ 3 2 1 及びアミノ酸

番号 3 5 9 ~ 3 9 7 で示されるアミノ酸 配列を  
有する上記 9 記載の蛋白質。

1 1 . 配列番号 1 において、転写活性化機能、D N A 結  
合性及びオリゴメリゼーション機能よりなる群から  
5 選択される少なくとも 1 種の機能を有するアミノ酸  
配列を有するポリペプチド。

1 2 . 以下の ( a ) 又は ( b ) に示すポリペプチド :

( a ) 配列番号 1 においてアミノ酸番号 1 ~ 5 9 で示  
されるアミノ酸配列を有するポリペプチド

10 ( b ) ( a ) に示すアミノ酸配列において、1 若しく  
は複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加された  
アミノ酸配列を有し、且つ転写活性化機能を有  
するポリペプチド。

1 3 . 以下の ( a ) 又は ( b ) に示すポリペプチド :

15 ( a ) 配列番号 1 においてアミノ酸番号 1 4 2 ~ 3 2  
1 で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチ  
ド

( b ) ( a ) に示すアミノ酸配列において、1 若しく  
は複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加された  
20 アミノ酸配列を有し、且つ D N A 結合性を有す  
るポリペプチド。

1 4 . 以下の ( a ) 又は ( b ) に示すポリペプチド :

( a ) 配列番号 1 においてアミノ酸番号 3 5 9 ~ 3 9  
7 で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチ  
ド

5 ( b ) ( a ) に示すアミノ酸配列において、1 若しくは  
複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加された  
アミノ酸配列を有し、且つオリゴメリゼーショ  
ン機能を有するポリペプチド。

更にまた本発明は、前述する p 5 1 遺伝子を含有する  
ベクター、該ベクターで形質転換された宿主細胞、並び  
10 に該宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物から蛋  
白質を回収することを特徴とする、p 5 1 蛋白の製造方  
法にかかるものである。

なお、本発明における「p 5 1」という称号は、単に  
15 本明細書において便宜上使用するものであって、本発明  
の遺伝子及びその遺伝子産物（蛋白質）等をなんら限定  
するものではない。

また、本発明において遺伝子（DNA）とは、2 本鎖  
DNA のみならず、それを構成するセンス鎖及びアンチ  
20 センス鎖といった各 1 本鎖の DNA を包含する趣旨であ  
り、またその長さに何ら制限されるものではない。従っ  
て、本発明の遺伝子（DNA）には、特に言及しない限



り、ヒトゲノムDNAを含む2本鎖DNA、及びcDNAを含む1本鎖DNA（センス鎖）、並びに該センス鎖と相補的な配列を有する1本鎖DNA（アンチセンス鎖）、およびそれらの断片のいずれもが含まれる。

- 5       以下、本明細書におけるアミノ酸、ペプチド、塩基配列、核酸等の略号による表示は、IUPAC、IUBの規定、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」（日本、米国及び欧州の三極特許庁）及び当該分野における慣用記号に従うものとする。

10

（1）p53遺伝子及びその同効物

本発明は、p53蛋白の作用又はその機能と同様若しくは同等の作用又は機能を有する蛋白質をコードするヒト由来の新規遺伝子に関する。

- 15       本発明の遺伝子は、従来公知のp53遺伝子及びp73遺伝子の配列から鋭意探索して選択された特定領域を利用して創意工夫のうえ、新たに創設したプライマーを用いてPCRを行うことによって得られたものである。具体的には、後記実施例で示すような創設プライマーを用いてPCRを行うことによってp53遺伝子及びp73遺伝子とは同一ではないが、両者に類似する遺伝子断片を得た。このDNA断片をプローブとして使用するこ
- 20

とにより、ヒト骨格筋 c D N A ライブラリーから任意に選択した c D N A クローン中に、p 5 3 蛋白のアミノ酸配列と高い相同性を有する新規蛋白をコードする c D N A クローンを単離することに成功した

- 5 得られた c D N A から演繹されたアミノ酸配列の計算分子量は約 5 0 , 8 9 4 D a であったので、本発明者らは、便宜上該 c D N A ( D N A ) を「ヒト p 5 1 A 遺伝子 (若しくは単に p 5 1 A 遺伝子)」と命名し、さらに該遺伝子によってコードされるアミノ酸配列を有する蛋白
- 10 質を「p 5 1 A 蛋白質 (若しくは p 5 1 A 蛋白)」と称した。

その後の研究により、p 5 1 c D N A クローンがコードする遺伝子には、選択的スプライシング変異体 (alternative splicing variant) があることが分かった。また

15 た種々のヒト組織における当該遺伝子転写産物の発現産生状況を調べた結果、当該産物 (蛋白質) には主に短いフォームと長いフォームとにスプライスされた形態が存在することが明らかとなった。

これらのスプライシング変異体にかかる p 5 1 c D N A から演繹したアミノ酸情報によると、短いフォームのスプライシング変異体は、前述する 4 4 8 アミノ酸 (分子量約 5 0 . 9 k D a ) を有する蛋白質 (p 5 1 A 蛋白)

20

をコードする遺伝子（p 5 1 A 遺伝子）であり、また長いフォームのスプライシング変異体は 6 4 1 アミノ酸（分子量約 7 1 . 9 k D a ）を有する蛋白質をコードする遺伝子であった。本発明において、便宜上、当該後者の遺伝子を「ヒト p 5 1 B 遺伝子（若しくは単に p 5 1 B 遺伝子）」と称することにし、また該遺伝子によってコードされるアミノ酸配列を有する蛋白質を「p 5 1 B 蛋白質（若しくは p 5 1 B 蛋白）」と称する。

また本発明においては、前記 p 5 1 A 遺伝子及び p 5 1 B 遺伝子を総括して「p 5 1 遺伝子」と呼び、p 5 1 A 蛋白及び p 5 1 B 蛋白を総括して「p 5 1 蛋白」と呼ぶことにする。

なお、p 5 1 遺伝子のスプライシング変異体には、T A 領域の一部を欠損しているもの等、複数の存在が確認されている。

これらの p 5 1 遺伝子の発現産物を調べたところ、本発明の p 5 1 遺伝子産物（p 5 1 蛋白）は、p 5 3 蛋白と類似の転写活性化作用、細胞の成長抑制活性、及びアポトーシス誘導活性を示した。また p 5 1 遺伝子のヒト組織における発現は、p 5 3 遺伝子の発現よりも組織限定的であり、また同様に組織限定的に発現する p 7 3 遺伝子の組織分布と重複するものの、その組織分布よりも

広範囲にわたるものであった。更に、ヒト腫瘍組織又は腫瘍細胞株において p 5 1 遺伝子の変異が確認された。

これらの知見から、本発明のヒト p 5 1 遺伝子は、p 5 3 腫瘍抑制遺伝子ファミリーの新たなメンバーであることが強く示唆された。

本発明の p 5 1 遺伝子の具体例としては、後述する実施例 1 に示されるクローン (p 5 1 A、p 5 1 B) が有する DNA 配列を有するものを挙げることができる。

10 p 5 1 A クローンが有する遺伝子としては、後記配列表中、配列番号 1 に示される 4 4 8 アミノ酸残基からなる蛋白質をコードする遺伝子 (1 3 4 4 ヌクレオチド) を挙げるることができる。具体的には、配列番号 2 において、オープンリーディングフレームに相当する 1 4 5 ~  
15 1 4 8 8 位に示される塩基配列を有する遺伝子である。

なお、当該 p 5 1 A c DNA クローンの全長塩基配列は、配列番号 2 に示すとおり 2 8 1 6 ヌクレオチドである。本発明の p 5 1 A 遺伝子には、当該配列番号 2 で示される塩基配列を含む遺伝子が含まれる。なお、配列番号  
20 2 に示す塩基配列において、開始コドン (A T G) は塩基番号 1 4 5 - 1 4 7 番目に位置しており、ポリアデニレーションシグナル (A A T A A) は、2 7 8 6 - 2

791に位置している。

なお、p51A遺伝子でコードされる448個のアミノ酸を有するp51A蛋白のアミノ酸配列を配列番号1に示すが、当該蛋白は、アミノ酸番号1～59位で示される転写活性化領域、アミノ酸番号142～321位で示されるDNA結合領域及びアミノ酸番号353～397位で示されるオリゴメリゼーション領域を有する。

該p51A蛋白の各領域のアミノ酸配列について、公知蛋白質p53及びp73それぞれの相当領域に対する  
10 相同性をGCGソフトウェア（ウィスコンシン・配列分析パッケージ、ジェネティクス・コンピューター・グループ製）を使用するFASTAプログラムを使用して（Person, W. R. and Lipman, D. J., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 85, 1435-1441 (1988)）調べた結果、表1に示す結果が得られた（図1、図2参照）。参考のため、同じ測定方法によって求めたp53蛋白質とp73β蛋白質との  
15 相同性を併記する。

< 表 1 >

20

	全配列	転写活性化領域	DNA結合領域	オリゴメリゼーション
p51A⇔p53	36 %	22 %	60 %	37 %
p51A⇔p73β	42 %	30 %	87 %	65 %
p53 ⇔p73	28 %	27 %	63 %	83 %

一方、p 5 1 B クローンが有する遺伝子としては、後記配列表中、配列番号 4 に示される 6 4 1 アミノ酸残基からなる蛋白質をコードする遺伝子（1 9 2 3 ヌクレオチド）を挙げることができる。具体的には、配列番号 5  
5 において、オープンリーディングフレームに相当する 1 4 5 ～ 2 0 6 7 位に示される塩基配列を有する遺伝子である。

なお、当該 p 5 1 B c D N A クローンの全長塩基配列は、配列番号 5 に示すとおり 2 2 7 0 ヌクレオチドである。本発明の p 5 1 B 遺伝子には、当該配列番号 5 で示  
10 される塩基配列を含む遺伝子が含まれる。

p 5 1 B 遺伝子でコードされる 6 4 1 個のアミノ酸を有する p 5 1 B 蛋白のアミノ酸配列を配列番号 4 に示すが、当該蛋白は、アミノ酸番号 1 ～ 5 9 位で示される転写活性化領域、アミノ酸番号 1 4 2 ～ 3 2 1 位で示される D N A 結合領域及びアミノ酸番号 3 5 3 ～ 3 9 7 位で示されるオリゴメリゼーション領域を有し、更にアミノ酸番号は特定  
15 できないが C 末端側の領域に付加的配列（S A M ドメイン）を有している。ここでは、当該 S A M ドメインを含む  
20 アミノ酸番号 3 5 3 ～ 6 4 1 位の領域を広義のオリゴメリゼーション領域とする。

該 p 5 1 B 蛋白の各領域のアミノ酸配列について、P

5 1 A 蛋白と同様に、公知蛋白質 p 7 3  $\alpha$  の相当領域に  
対する相同性を G C G ソフトウェアを使用する F A S T  
A プログラムを使用して調べた結果、図 3 に示す結果が  
得られた。図 3 において、四角のボックスで囲まれた部  
5 分が、p 5 1 B 蛋白と p 7 3  $\alpha$  蛋白とが共通するアミノ  
酸配列であり、これから本発明の p 5 1 B 蛋白のアミノ  
酸配列は広範囲にわたって p 7 3  $\alpha$  蛋白の配列と相同性  
があることがわかる。

このように本発明の p 5 1 遺伝子には、配列番号 1 に  
10 示されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする塩基  
配列を有するヒト p 5 1 A 遺伝子、及び配列番号 4 に示  
されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする塩基配  
列を有するヒト p 5 1 B 遺伝子が含まれる。ただし、本  
発明の P 5 1 遺伝子は特にこれらに限定されることな  
15 く、当該ヒト p 5 1 遺伝子の相同物をも包含するもので  
ある。

ここで「ヒト p 5 1 遺伝子の相同物」とは、前述する  
p 5 1 A 遺伝子または p 5 1 B 遺伝子と配列相同性を有  
し、上記構造的特徴並びに遺伝子発現パターンにおける  
20 共通性、及び上記したようなそのもの若しくはその遺伝  
子産物（蛋白質）の生物学的機能の類似性によりひとつ  
の遺伝子ファミリーと認識される一連の関連遺伝子を意

味するものであり、ヒト p 5 1 遺伝子のスプライシング変異体やアレル体（対立遺伝子）も当然含まれる。

かかる相同物としては、例えば配列番号 1 で表される特定のアミノ酸配列において、一乃至は複数の改変を有する蛋白質であって、且つ該配列を有する p 5 1 A 蛋白と同様な作用又は機能を有する蛋白質をコードする遺伝子を挙げることができる。当該遺伝子としては、好適には配列番号 1 で表されるアミノ酸配列と一定の相同性を保持したアミノ酸配列をコードするものを挙げることができる。

上記アミノ酸配列における相同性は、前述する G C G ソフトウェアを使用する F A S T A プログラムを使用した測定において、通常、アミノ酸配列の全体で約 4 5 % 以上、好ましくは約 5 0 % 以上であることができる。好ましくは転写活性化領域、D N A 結合領域またはオリゴメリゼーション領域のいずれか少なくとも一つ領域において一定以上の相同性を有することが好ましく、例えば、転写活性化領域における相同性として約 3 5 % 以上、好ましくは 4 5 % 以上、D N A 結合領域における相同性として 8 8 % 以上、好ましくは約 9 0 % 以上、オリゴメリゼーション領域における相同性として約 7 0 % 以上、好ましくは約 8 0 % 以上のいずれかを挙げることができる。



る。

即ち、本発明の遺伝子には、上記性質を満たす限り、例えば配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において 1 又は数個乃至複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加された  
5 アミノ酸配列からなる蛋白質をコードする塩基配列を含む遺伝子が包含される。

ここで、「アミノ酸の欠失、置換又は付加」の程度及びそれらの位置等は、改変された蛋白質が、配列番号 1 または 4 で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質（p 5 1  
10 A 蛋白または p 5 1 B 蛋白）と同様の機能を有する同効物であれば特に制限されない。すなわち、本発明において「p 5 1 活性」とは、p 5 1 A 蛋白または p 5 1 B 蛋白で代表される p 5 1 蛋白が有する活性並びに機能を意味し、具体的には、腫瘍細胞成長抑制活性、アポトーシ  
15 ス誘導活性、細胞における転写調節機能等を挙げることができる。

本発明の p 5 1 蛋白は、細胞増殖抑制因子として知られている p 5 3 蛋白と同様な作用を有していると思われる。このため本明細書において、p 5 1 蛋白の作用又は  
20 機能として表わされる「p 5 1 活性」とは、公知の p 5 3 蛋白の様々な作用又は機能によって定義することも可能である。

ここで p 5 3 蛋白の作用又は機能としては、細胞における転写調節機能、他の細胞内蛋白質と結合することによるシグナル伝達機能、DNA複製に関する蛋白質複合体の構成要素としての働き、DNA結合能及びエキソヌクレアーゼ活性等、またこれらの機能が複合的に作用することに発揮される細胞の細胞周期停止機能、アポトーシス誘導作用、DNA修復機能、DNA複製調節又は分化誘導作用等を挙げることができるが、本発明の p 5 1 蛋白もこれらの作用又は機能を、一部もしくは全て有しているものと考えられる。

アミノ酸配列の改変（変異）等は、天然において、例えば突然変異や翻訳後の修飾等により生じることもあるが、天然由来の遺伝子に基づいて人為的に改変することもできる。

本発明は、このような改変・変異の原因及び手段等を問わず、本発明の p 5 1 蛋白にかかる上記特性を有する蛋白をコードする全ての改変遺伝子を包含するものである。

上記の人為的な改変手段としては、例えばサイトスペシフィック・ミュータジェネシス〔Methods in Enzymology, 154, 350, 367-382 (1987); 同 100, 468 (1983); Nucleic Acids Res., 12, 9441 (1984); 続生化学実験講

座 1 「遺伝子研究法 II」、日本生化学会編, p105 (1986)) 等の遺伝子工学的手法、リン酸トリエステル法やリン酸アミダイト法等の化学合成手段 [J. Am. Chem. Soc., 89, 4801 (1967); 同 91, 3350 (1969); Science, 150, 178 (1968); Tetrahedron Lett., 22, 1859 (1981); 同 24, 245 (1983)] 及びそれらの組合せ方法等が例示できる。より具体的には、DNA の合成は、ホスホルアミダイト法またはトリエステル法による化学合成によることもでき、市販されている自動オリゴヌクレオチド合成装置上で行うこともできる。二本鎖断片は、相補鎖を合成し、適当な条件下で該鎖を共にアニーリングさせるか、または適当なプライマー配列と共に DNA ポリメラーゼを用い相補鎖を付加するかによって、化学合成した一本鎖生成物から得ることもできる。

15 本発明の遺伝子の具体的な態様として、配列番号 2 に示される塩基配列において、塩基番号 1 4 5 ~ 1 4 8 8 に示される塩基配列を有する遺伝子、または配列番号 5 に示される塩基配列において、塩基番号 1 4 5 ~ 2 0 6 7 に示される塩基配列を有する遺伝子を例示できる。これら  
20 これらの塩基配列は、前述の配列番号 1 または 4 に示されるアミノ酸配列の各アミノ酸残基をコードするコドンの一つの組合せ例でもある。このため、本発明の遺伝子は

これら特定の塩基配列を有する遺伝子に限らず、各アミノ酸残基に対して任意のコドンを組合せ、選択した塩基配列を有することも可能である。コドンの選択は、常法に従うことができ、例えば利用する宿主のコドン使用頻度等を考慮することができる〔Ncleic Acids Res., 9, 43 (1981)〕。

更に、本発明の遺伝子は、前記のとおり、配列番号 2 に示される塩基配列において、塩基番号 1 4 5 ~ 1 4 8 8 (以下、単に塩基配列(145-1488)ともいう。)に示される塩基配列と一定の相同性を有する塩基配列からなるものも包含する。

かかる遺伝子としては、例えば、0.1% SDS を含む 0.2 × SSC 中 50℃ 又は 0.1% SDS を含む 1 × SSC 中 60℃ のストリンジェントな条件下で塩基配列(145-1488)からなる DNA とハイブリダイズする塩基配列を有する遺伝子を例示することができる。

本発明の遺伝子は、本発明により具体的に教示された配列番号 2 の配列情報に基づいて、一般的遺伝子工学的的手法により容易に製造・取得することができる〔Molecular Cloning 2d Ed, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989); 続生化学実験講座「遺伝子研究法 I、II、III」、日本生化学会編 (1986) 等参照〕。

具体的には、本発明 p 5 1 遺伝子が発現される適当な起源より、常法に従って c D N A ライブラリーを調製し、該ライブラリーから、本発明の p 5 1 遺伝子に特有の適当なプローブや抗体を用いて所望クローンを選択することにより実施できる〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 78, 6613 (1981); Science, 222, 778 (1983)等〕。

上記において、c D N A の起源としては、本発明の遺伝子を発現する各種の細胞、組織やこれらに由来する培養細胞等が例示される。また、これらからの全 R N A の分離、m R N A の分離や精製、c D N A の取得とそのクローニング等はいずれも常法に従って実施することができる。また、c D N A ライブラリーは市販されてもおり、本発明においてはそれら c D N A ライブラリー、例えばクローンテック社 (Clontech Lab. Inc.) 等より市販されている各種 c D N A ライブラリー等を用いることもできる。

本発明の遺伝子を c D N A ライブラリーからスクリーニングする方法も、特に制限されず、通常の方法に従うことができる。

具体的には、例えば c D N A によって産生される蛋白質に対して、該蛋白質特異抗体を使用した免疫的スクリーニングにより対応する c D N A クローンを選択する方

法、目的のDNA配列に選択的に結合するプローブを用いたブランクハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション等やこれらの組合せ等を例示できる。

ここで用いられるプローブとしては、本発明の遺伝子の塩基配列に関する情報をもとにして化学合成されたDNA等が一般的に例示できるが、既に取得された本発明遺伝子そのものやその断片も良好に利用できる。また、本発明のp51遺伝子の塩基配列情報に基づき設定したセンス・プライマー、アンチセンス・プライマーをスクリーニング用プローブとして用いることもできる。

本発明の遺伝子の取得に際しては、PCR法〔Science, 230, 1350 (1985)〕またはその変法によるDNA若しくはRNA増幅法が好適に利用できる。殊に、ライブラリーから全長のcDNAが得られ難いような場合には、RACE法〔Rapid amplification of cDNA ends; 実験医学、12(6), 35 (1994)〕、特に5'-RACE法〔M.A. Frohman, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 8, 8998 (1988)〕等の採用が好適である。

かかるPCR法の採用に際して使用されるプライマーは、本発明によって明らかにされたp51遺伝子の配列情報に基づいて適宜設定することができ、これは常法に従って合成できる。尚、増幅させたDNA若しくはRNA

A断片の単離精製は、前記の通り常法に従うことができ、例えばゲル電気泳動法、ハイブリダイゼーション法等によることができる。

また、上記の方法で得られる p 5 1 遺伝子或いは p 5 1 遺伝子の各種 D N A 断片は、常法、例えばジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 74, 5463 (1977)] や マキサム - ギルバート法 [Methods in Enzymology, 65, 499 (1980)] 等に従って、また簡便には市販のシークエンスキット等を用いて、その塩基配列を決定することができる。

10 本発明の p 5 1 遺伝子によれば、例えば該遺伝子の一部又は全部の塩基配列を利用することにより、ヒトなどの個体もしくは各種組織における本発明 p 5 1 遺伝子の発現の有無を特異的に検出することができる。

かかる検出は常法に従って行うことができ、例えば R 15 T - P C R [Reverse transcribed-Polymerase chain reaction; E. S. Kawasaki, et al., Amplification of R N A. In PCR Protocol, A Guide to methods and applications, Academic Press, Inc., San Diego, 21-27 (1991)] による R N A 増幅やノーザンブロッティング解析 [Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Lab. (1989)]、in situ R T - P C R [Nucl. Acids Res., 21, 3159-3166 (1993)] や in situ ハイブリダイゼーション等を利用

した細胞レベルでの測定、N A S B A 法〔Nucleic acid sequence-based amplification, Nature, 350, 91-92 (1991)〕及びその他の各種方法を挙げることができる。好適的には、R T - P C R - S S C P による検出法を挙げ  
5 けることができる。

尚、ここでP C R 法に用いられるプライマーとしては、本発明 p 5 1 遺伝子（部分D N A を含む）を特異的に増幅できる該遺伝子特有のものである限り、特に制限はなく、本発明の p 5 1 遺伝子の配列情報に基いて適宜設定  
10 することができる。通常プライマーとして1 0 ～ 3 5 程度のヌクレオチド、好ましくは1 5 ～ 3 0 ヌクレオチド程度の長さを有する本発明の p 5 1 遺伝子の部分配列を有するものを挙げることができる。

このように、本発明の遺伝子には、本発明にかかるヒ  
15 ト p 5 1 遺伝子を検出するための特異プライマー及び／又は特異プローブとして使用されるD N A 断片もまた包含されるものである。

当該D N A 断片は、塩基配列(145-1488)からなるD N A とストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることを特徴とするD N A として規定することができる。こ  
20 こで、ストリンジェントな条件としては、プライマー又はプローブとして用いられる通常の条件を挙げることがで



き、特に制限はされないが、例えば、前述するような 0.1 % SDS を含む 0.2 × SSC 中 50 °C の条件又は 0.1 % SDS を含む 1 × SSC 中 60 °C の条件を例示することができる。

- 5      本発明のヒト p 5 1 遺伝子によれば、通常の遺伝子工学的手法を用いることにより、該遺伝子産物（p 5 1 蛋白）を含む蛋白質を容易に大量に、安定して製造することができる。

10      （2） p 5 1 蛋白

ゆえに、本発明は前述する本発明の遺伝子によってコードされる p 5 1 蛋白を提供する。

- 本発明の蛋白質の具体的態様としては、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有する p 5 1 A 蛋白及び配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を有する p 5 1 B 蛋白と称  
15      される蛋白質を挙げることができるが、本発明の蛋白質は、当該特定の p 5 1 A 蛋白及び p 5 1 B 蛋白に限定されることなくそれらと相同物であればよい。相同物としては、上記各蛋白質のアミノ酸配列において、1 若しくは  
20      は数個乃至複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を有しており、且つ前述する p 5 1 活性を有する蛋白質を有するものを挙げることができる。具体

的には、前述する p 5 1 遺伝子の相同物（スプライシング変異体及びアレル体を含む p 5 1 関連遺伝子）の遺伝子産物を挙げることができる。

5 本発明の蛋白質は、本発明で提供するヒト p 5 1 遺伝子の配列情報に基づいて、常法の遺伝子組換え技術〔例えば、Science, 224, 1431 (1984) ; Biochem. Biophys. Res. Comm., 130, 692 (1985) ; Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 80, 5990 (1983)等参照〕に従って調製することができる。

10

（ 3 ） p 5 1 蛋白の機能的領域を含むポリペプチド

さらに本発明は上記 p 5 1 蛋白の一部領域を含むポリペプチドに関する。

15 当該ポリペプチドは、p 5 1 蛋白を構成する各種機能的領域のいずれかのアミノ酸配列を有するものであることが好ましく、具体的には p 5 1 蛋白が有する転写活性化領域、DNA 結合領域及びオリゴメリゼーション領域よりなる群から選択される少なくとも 1 つの領域のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

20 前述するように p 5 1 A 蛋白の転写活性化領域、DNA 結合領域及びオリゴメリゼーション領域は、それぞれ配列番号 1 で示される p 5 1 A 蛋白のアミノ酸配列にお

いてアミノ酸番号 1 ～ 59 位、アミノ酸番号 142 ～ 321 位及びアミノ酸番号 359 ～ 397 位に位置する。

従って、本発明のポリペプチドには下記のものが含まれる。

- 5 (i) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 ～ 59 で示されるアミノ酸配列（以下、単にアミノ酸配列 1 (1-59) という。）を有するポリペプチド並びにその同効物。

なお、当該同効物にはアミノ酸配列 1 (1-59) において、1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加された  
10 アミノ酸配列を有し、且つ転写活性化機能を有するポリペプチドを挙げることができる。アミノ酸配列の改変の程度は、転写活性化機能を有する限り、特に制限されないが、アミノ酸配列 1 (1-59) との相同性が約 35 % 以上、好ましくは 45 % 以上保持されているものであることが  
15 望ましい。

(ii) 配列番号 1 のアミノ酸番号 142 ～ 321 で示されるアミノ酸配列（以下、単にアミノ酸配列 1 (142-321) という。）を有するポリペプチド並びにその同効物。

なお、当該同効物にはアミノ酸配列 1 (142-321) において、20 て、1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を有し、且つ DNA 結合性を有するポリペプチドを挙げることができる。アミノ酸配列の改変

の程度は、DNA 結合性を有する限り、特に制限されないが、アミノ酸配列 1 (142-321) との相同性が約 88 % 以上、好ましくは 90 % 以上保持されているものであることが望ましい。

- 5 (iii) 配列番号 1 のアミノ酸番号 353 ~ 397 で示されるアミノ酸配列 (以下、単にアミノ酸配列 1 (353-397) という。) を有するポリペプチド並びにその同効物。

なお、当該同効物にはアミノ酸配列 1 (353-397) において、1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を有し、且つオリゴメリゼーション機能  
10 を有するポリペプチドを挙げることができ、例えば p 51 B 蛋白の広義のオリゴメリゼーション領域 (配列番号 4 のアミノ酸番号 353 ~ 641 位) を包含する。アミノ酸配列の改変の程度は、オリゴメリゼーション機能を有する限り、特に制限されないが、アミノ酸配列 1 (353-397) との相同性が約 70 % 以上、好ましくは 80 % 以上保持されているものであることが望ましい。  
15

なお、本発明は、上記アミノ酸配列 1 (1-59) 若しくはその同効物、アミノ酸配列 1 (142-321) 若しくはその同効物、アミノ酸配列 1 (353-397) 若しくはその同効物のい  
20 ずれか一つのアミノ酸配列を一領域に含むポリペプチドであっても、また当該任意の二以上のアミノ酸配列を連

続的または非連続的な領域として含むポリペプチドであってもよい。

更に本発明には、これらのポリペプチドをコードする塩基配列を有する遺伝子（DNA）が含まれる。具体的には、前述のアミノ酸配列 1（1-59）をコードする塩基配列としては配列番号 2 において塩基番号 1 4 5 ～ 3 2 1 で示される塩基配列を、アミノ酸配列 1（142-321）をコードする塩基配列としては配列番号 2 において塩基番号 5 6 8 ～ 1 1 0 7 で示される塩基配列を、アミノ酸配列 1（353-397）をコードする塩基配列としては配列番号 2 において塩基番号 1 2 0 1 ～ 1 3 3 5 で示される塩基配列を挙げるることができる。

（４） p 5 1 蛋白の製造法及び製造に使用するもの

また本発明は、該 p 5 1 蛋白の製造方法、並びにその製造に用いられる、例えば上記遺伝子を含むベクター、該ベクターによって形質転換された宿主細胞を提供するものである。

該蛋白質の製造は、より詳細には、該所望の蛋白をコードする遺伝子が宿主細胞中で発現できるように組換え DNA（発現ベクター）を作成し、これを宿主細胞に導入して形質転換し、該形質転換体を培養し、次いで得ら

れる培養物から所望の蛋白質を回収することにより行なわれる。

ここで宿主細胞としては、真核生物及び原核生物のいずれをも用いることができる。

- 5 真核生物の細胞には、脊椎動物、酵母等の真核微生物の細胞が含まれる。脊椎動物細胞としては、例えばサルの細胞であるC O S細胞〔Cell, 23, 175 (1981)〕、チャイニーズ・ハムスター卵巢細胞及びそれらのジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 77, 10 4216 (1980)〕等が通常よく用いられるが、これらに限定される訳ではない。また、真核微生物としては、酵母が一般によく用いられ、中でもサッカロミセス属酵母が有利に利用できる。

- 原核生物の宿主としては、大腸菌や枯草菌が一般によく用いられる。大腸菌のなかでも、特にエシエリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K 1 2 株等がよく用いられる。 15

発現ベクターは、本発明の遺伝子を含んでおり且つ該遺伝子を発現することができるものであれば特に制限されず、一般に宿主細胞との関係から適宜選択される。

- 20 宿主細胞として脊椎動物細胞を使用する場合、発現ベクターとしては、通常発現しようとする本発明の遺伝子の上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部

位、ポリアデニル化部位及び転写終了配列等を保有するものを使用でき、これは更に必要により複製起点を有していてもよい。該発現ベクターの例としては、例えば、S V 4 0 の初期プロモーターを保有する p S V 2 dhfr〔M  
5 ol. Cell. Biol., 1, 854 (1981)〕等を例示することができる。

宿主細胞として酵母等の真核微生物の細胞を使用する場合、発現ベクターとしては、例えば酸性ホスファターゼ遺伝子に対するプロモーターを有する p A M 8 2〔Pr  
10 oc. Natl. Acad. Sci., USA., 80, 1 (1983)〕等を利用でき、本発明のベクターは該プロモーターの上流域に本発明の遺伝子を挿入することによって調製することができる。好適には、原核生物遺伝子と融合した融合ベクターを挙げることができ、該ベクターの具体例としては、  
15 例えば分子量 2 6 0 0 0 の G S T ドメイン (S. japonicus由来) を有する p G E X - 2 T K や p G E X - 4 T - 2 等が例示される。

宿主細胞として原核生物の細胞を使用する場合、発現ベクターとしては、例えば該宿主細胞中で複製可能なプラスミドベクターであって、このベクター中に所望遺伝子が発現できるように該遺伝子の上流にプロモーター及び S D (シャイン・アンド・ダルガーノ) 塩基配列、更  
20

に蛋白合成開始に必要な開始コドン（例えば A T G ）を付与した発現プラスミドを挙げることができる。特に大腸菌（例えばエシエリヒア・コリ K 1 2 株等）を宿主細胞をして用いる場合は、発現ベクターとしては一般に p B R 3 2 2 及びその改良ベクターがよく用いられる。ただしこれらに限定されず公知の各種の菌株及びベクターをも利用できる。なお、上記プロモーターとしては、例えばトリプトファン(trp)プロモーター、l p p プロモーター、l a c プロモーター、P L / P R プロモーター等  
5  
10 を使用できる。

かかる本発明の発現ベクターを宿主細胞に導入する方法並びにこれによる形質転換方法は、特に限定されず、一般的な各種方法を採用することができる。

また得られる形質転換体は、常法に従い培養でき、該  
15 培養により所望のように設計した遺伝子によりコードされる本発明の目的の蛋白が、形質転換体の細胞内、細胞外又は細胞膜上に発現、生産（蓄積、分泌）される。

該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択利用でき、培  
20 養も宿主細胞の生育に適した条件下で実施できる。

斯くして得られる本発明の組換え蛋白は、所望により、その物理的性質、化学的性質等を利用した各種の分離操



作〔「生化学データブックII」、1175-1259 頁、第1版第1刷、1980年 6月23日株式会社東京化学同人発行；Biochemistry, 25(25), 8274 (1986); Eur. J. Biochem., 163, 313 (1987) 等参照〕により分離、精製できる。

- 5      該方法としては、具体的には、通常の再構成処理、蛋白沈澱剤による処理（塩析法）、遠心分離、浸透圧ショック法、超音波破碎、限外濾過、分子篩クロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、
- 10    高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せが例示でき、特に好ましい方法としては、本発明の蛋白質に対する特異的な抗体を結合させたカラムを利用したアフィニティクロマトグラフィー等を例示することができる。
- 15    尚、本発明の蛋白質をコードする所望の遺伝子の設計に際しては、配列番号2において塩基配列（145-1488）で示されるヒト p 5 1 A 遺伝子の塩基配列または配列番号5において塩基配列（145-2067）で示されるヒト p 5 1 B 遺伝子の塩基配列を良好に利用することができる。該
- 20    遺伝子は、所望により、各アミノ酸残基を示すコドンに適宜選択変更して利用することも可能である。

また、ヒト p 5 1 A 遺伝子又はヒト p 5 1 B 遺伝子で

コードされるアミノ酸配列において、その一部のアミノ酸残基ないしはアミノ酸配列を置換、欠失、付加等により改変する場合には、例えばサイトスペシフィック・ミュータゲネシス等の前記した各種方法により行うことができる。

本発明の蛋白質は、また、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列または配列番号 4 に示されるアミノ酸配列に従って、一般的な化学合成法により製造することができる。該方法には、通常の液相法及び固相法によるペプチド合成法が包含される。

かかるペプチド合成法は、より詳しくは、アミノ酸配列情報に基づいて、各アミノ酸を 1 個ずつ逐次結合させ鎖を延長させていく所謂ステップワイズエロンゲーション法と、アミノ酸数個からなるフラグメントを予め合成し、次いで各フラグメントをカップリング反応させるフラグメント・コンデンセーション法とを包含し、本発明ペプチドの合成は、そのいずれによってもよい。

上記ペプチド合成に採用される縮合法も、常法に従うことができ、例えば、アジド法、混合酸無水物法、DCC 法、活性エステル法、酸化還元法、DPPA（ジフェニルホスホリルアジド）法、DCC + 添加物（1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシサクシンア

ミド、N-ヒドロキシー-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド等)法、ウッドワード法等を例示できる。

5 これら各方法に利用できる溶媒も、この種ペプチド縮合反応に使用されることのよく知られている一般的なもののから適宜選択することができる。その例としては、例えばジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ヘキサホスホロアミド、ジオキサン、テトラヒドロフラン(THF)、酢酸エチル等及びこれら  
10 の混合溶媒等を挙げることができる。

尚、上記ペプチド合成反応に際して、反応に関与しないアミノ酸乃至ペプチドにおけるカルボキシル基は、一般にはエステル化により、例えばメチルエステル、エチルエステル、第3級ブチルエステル等の低級アルキルエステル、例えばベンジルエステル、p-メトキシベンジル  
15 ステル、p-ニトロベンジルエステル等のアラルキルエステル等として保護することができる。

また、側鎖に官能基を有するアミノ酸、例えばチロシン残基の水酸基は、アセチル基、ベンジル基、ベンジ  
20 オキシカルボニル基、第3級ブチル基等で保護されてもよいが、必ずしもかかる保護を行なう必要はない。更に、例えばアルギニン残基のグアニジノ基は、ニトロ基、ト

シル基、p-メトキシベンゼンスルホニル基、メチレン-2-スルホニル基、ベンジルオキシカルボニル基、イソボルニルオキシカルボニル基、アダマンチルオキシカルボニル基等の適当な保護基により保護することができる。

上記保護基を有するアミノ酸、ペプチド及び最終的に得られる本発明蛋白質におけるこれら保護基の脱保護反応もまた、慣用される方法、例えば接触還元法や、液体アンモニア/ナトリウム、フッ化水素、臭化水素、塩化水素、トリフルオロ酢酸、酢酸、蟻酸、メタンスルホン酸等を用いる方法等に従って実施することができる。

斯くして得られる本発明の蛋白質は、前記した各種の方法、例えばイオン交換樹脂、分配クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー、向流分配法等のペプチド化学の分野で汎用される方法に従って、適宜精製を行なうことができる。

本発明の蛋白質は、p 5 1 蛋白の特異抗体を作成する為の免疫抗原としても好適に利用でき、これら抗原を利用することにより、所望の抗血清（ポリクローナル抗体）及びモノクローナル抗体を取得することができる。

該抗体の製造方法自体は、当業者によく理解されているところであり、本発明においてもこれら常法に従うこ

とができる〔続生化学実験講座「免疫生化学研究法」、日本生化学会編（1986）等参照〕。かくして得られる抗体は、例えば p 5 1 蛋白の精製及びその免疫学的手法による測定ないしは識別等に有利に利用することができる。

- 5       また、本発明の蛋白質は、これを有効成分とする医薬品として医薬分野において有用である。

（ 5 ） p 5 1 蛋白を含む医薬組成物

- 従って、本発明は前述する本発明の蛋白質を含む医薬  
10    に関する。

- 該蛋白質には、その医薬的に許容される塩もまた包含される。かかる塩には、当業界で周知の方法により調製される、例えばナトリウム、カリウム、リチウム、カルシウム、マグネシウム、バリウム、アンモニウム等の無  
15    毒性アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩及びアンモニウム塩等が包含される。更に上記塩には、本発明ペプチドと適当な有機酸ないし無機酸との反応による無毒性酸付加塩も包含される。代表的無毒性酸付加塩としては、  
例えば塩酸塩、塩化水素酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、  
20    重硫酸塩、酢酸塩、蔞酸塩、吉草酸塩、オレイン酸塩、  
ラウリン酸塩、硼酸塩、安息香酸塩、乳酸塩、リン酸塩、  
p - トルエンスルホン酸塩（トシレート）、クエン酸塩、

マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、スルホン酸塩、グリコール酸塩、マレイン酸塩、アスコルビン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩及びナブシレート等が例示される。

- 5        また本発明には、上記本発明の蛋白質を活性成分として、それを薬学的有効量、適当な無毒性医薬担体ないし希釈剤と共に含有する医薬組成物又は医薬製剤が含まれる。

- 10        上記医薬組成物（医薬製剤）に利用できる医薬担体としては、製剤の使用形態に応じて通常使用される、充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤等の希釈剤或は賦形剤等を例示でき、これらは得られる製剤の投与単位形態に応じて適宜選択使用される。

- 15        特に好ましい本発明医薬製剤は、通常の蛋白製剤等に使用され得る各種の成分、例えば安定化剤、殺菌剤、緩衝剤、等張化剤、キレート剤、pH調整剤、界面活性剤等を適宜使用して調製される。

- 20        上記安定化剤としては、例えばヒト血清アルブミンや通常のL-アミノ酸、糖類、セルロース誘導体等を例示でき、これらは単独で又は界面活性剤等と組合せて使用できる。特にこの組合せによれば、有効成分の安定性をより向上させ得る場合がある。

上記L-アミノ酸としては、特に限定はなく例えばグリシン、システイン、グルタミン酸等のいずれでもよい。

上記糖としても特に限定はなく、例えばグルコース、マンノース、ガラクトース、果糖等の単糖類、マンニトール、イノシトール、キシリトール等の糖アルコール、  
5 ショ糖、マルトース、乳糖等の二糖類、デキストラン、ヒドロキシプロピルスターチ、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸等の多糖類等及びそれらの誘導体等を使用できる。

10 界面活性剤としても特に限定はなく、イオン性及び非イオン性界面活性剤のいずれも使用でき、例えばポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステル系、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系、ソルビタンモノアシルエステル系、脂肪酸グリセリド系等を使用  
15 できる。

セルロース誘導体としても特に限定はなく、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナ  
20 トリウム等を使用できる。

上記糖類の添加量は、有効成分1  $\mu$ g 当り約0.0001mg程度以上、好ましくは約0.01～10mg程

度の範囲とするのが適当である。界面活性剤の添加量は、有効成分  $1 \mu\text{g}$  当り約  $0.00001 \text{ mg}$  程度以上、好ましくは約  $0.0001 \sim 0.01 \text{ mg}$  程度の範囲とするのが適当である。ヒト血清アルブミンの添加量は、有効成分  $1 \mu\text{g}$  当り約  $0.0001 \text{ mg}$  程度以上、好ましくは約  $0.001 \sim 0.1 \text{ mg}$  程度の範囲とするのが適当である。アミノ酸は、有効成分  $1 \mu\text{g}$  当り約  $0.001 \sim 10 \text{ mg}$  程度とするのが適当である。また、セルロース誘導体の添加量は、有効成分  $1 \mu\text{g}$  当り約  $0.00001 \text{ mg}$  程度以上、好ましくは約  $0.001 \sim 0.1 \text{ mg}$  程度の範囲とするのが適当である。

本発明医薬製剤中に含まれる有効成分の量は、広範囲から適宜選択されるが、通常約  $0.00001 \sim 70$  重量%、好ましくは  $0.0001 \sim 5$  重量%程度の範囲とするのが適当である。

また本発明の医薬製剤中には、各種添加剤、例えば緩衝剤、等張化剤、キレート剤等をも添加することができる。ここで緩衝剤としては、ホウ酸、リン酸、酢酸、クエン酸、 $\epsilon$ -アミノカプロン酸、グルタミン酸及び／又はそれらに対応する塩（例えばそれらのナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ金属塩やアルカリ土類金属塩）等を例示できる。等張



化剤としては、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、糖類、グリセリン等を例示できる。またキレート剤としては、例えばエデト酸ナトリウム、クエン酸等を例示できる。

- 5       本発明の医薬製剤は、溶液製剤として使用できる他に、これを凍結乾燥化し保存し得る状態にした後、用時水、生理的食塩水等を含む緩衝液等で溶解して適当な濃度に調製した後に使用することも可能である。

- 10       本発明の医薬製剤の投与単位形態としては、各種の形態が治療目的に応じて選択でき、その代表的なものとしては、錠剤、丸剤、散剤、粉末剤、顆粒剤、カプセル剤等の固体投与形態や、溶液、懸濁剤、乳剤、シロップ、エリキシル等の液剤投与形態が含まれ、これらは更に投与経路に応じて経口剤、非経口剤、経鼻剤、経膈剤、坐  
15       剤、舌下剤、軟膏剤等に分類され、それぞれ通常の方法に従い、調合、成形乃至調製することができる。

- 20       例えば、錠剤の形態に成形するに際しては、上記製剤担体として例えば乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、尿素、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロース、ケイ酸、リン酸カリウム等の賦形剤；水、エタノール、プロパノール、単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン溶液、カルボキシメチルセルロー

ス、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン等の結合剤；カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、ラミナラン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム等の崩壊剤；ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド等の界面活性剤；白糖、ステアリン、カカオバター、水素添加油等の崩壊抑制剤；第4級アンモニウム塩基、ラウリル硫酸ナトリウム等の吸収促進剤；グリセリン、デンプン等の保湿剤；デンプン、乳糖、カオリン、ベントナイト、コロイド状ケイ酸等の吸着剤；精製タルク、ステアリン酸塩、ホウ酸末、ポリエチレングリコール等の滑沢剤等を使用できる。

更に錠剤は必要に応じ通常の剤皮を施した錠剤、例えば糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶被錠、フィルムコーティング錠とすることができ、また二重錠ないしは多層錠とすることもできる。

丸剤の形態に成形するに際しては、製剤担体として例えばブドウ糖、乳糖、デンプン、カカオ脂、硬化植物油、カオリン、タルク等の賦形剤；アラビアゴム末、トラガ

ント末、ゼラチン、エタノール等の結合剤；ラミナラン、カンテン等の崩壊剤等を使用できる。

カプセル剤は、常法に従い通常本発明の有効成分を上記で例示した各種の製剤担体と混合して硬質ゼラチンカプセル、軟質カプセル等に充填して調整される。

経口投与用液体投与形態は、慣用される不活性希釈剤、例えば水、を含む医薬的に許容される溶液、エマルジョン、懸濁液、シロップ、エリキシル等を包含し、更に湿潤剤、乳剤、懸濁剤等の助剤を含ませることができ、これらは常法に従い調製される。

非経口投与用の液体投与投与形態、例えば滅菌水性乃至非水性溶液、エマルジョン、懸濁液等への調製に際しては、希釈剤として例えば水、エチルアルコール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル及びオリーブ油等の植物油等を使用でき、また注入可能な有機エステル類、例えばオレイン酸エチル等を配合できる。これらには更に通常の溶解補助剤、緩衝剤、湿潤剤、乳化剤、懸濁剤、保存剤、分散剤等を添加することもできる。

滅菌は、例えばバクテリア保留フィルターを通過させ

る濾過操作、殺菌剤の配合、照射処理及び加熱処理等により実施できる。また、これらは使用直前に滅菌水や適当な滅菌可能媒体に溶解することのできる滅菌固体組成物形態に調製することもできる。

- 5 坐剤や膣投与用製剤の形態に成形するに際しては、製剤担体として、例えばポリエチレングリコール、カカオ脂、高級アルコール、高級アルコールのエステル類、ゼラチン及び半合成グリセライド等を使用できる。

- 10 ペースト、クリーム、ゲル等の軟膏剤の形態に成形するに際しては、希釈剤として、例えば白色ワセリン、パラフィン、グリセリン、セルロース誘導体、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、シリコン、ベントナイト及びオリーブ油等の植物油等を使用できる。

- 15 経鼻又は舌下投与用組成物は、周知の標準賦形剤を用いて、常法に従い調製することができる。

尚、本発明の医薬製剤中には、必要に応じて着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤等や他の医薬品等を含有させることもできる。

- 20 上記医薬製剤の投与方法は、特に制限がなく、各種製剤形態、患者の年齢、性別その他の条件、疾患の程度等に応じて決定される。例えば錠剤、丸剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤及びカプセル剤は経口投与され、注射剤は

単独で又はブドウ糖やアミノ酸等の通常の補液と混合して静脈内投与され、更に必要に応じ単独で筋肉内、皮内、皮下もしくは腹腔内投与され、坐剤は直腸内投与され、経膣剤は膣内投与され、経鼻剤は鼻腔内投与され、舌下剤は口腔内投与され、軟膏剤は経皮的に局所投与される。

上記医薬製剤中に含有されるべき本発明の蛋白質の量及びその投与量は、特に限定されず、所望の治療効果、投与方法、治療期間、患者の年齢、性別その他の条件等に応じて広範囲より適宜選択されるが、一般的には、該投与量は、通常、1日当たり体重1kg当たり、約0.01μg～10mg程度、好ましくは約0.1μg～1mg程度とするのがよく、該製剤は1日に1～数回に分けて投与することができる。

#### 15 (6) 遺伝子治療

また、本発明は、本発明のヒトp51遺伝子を利用して行う遺伝子治療法を提供する。該治療法は、例えば変異p51遺伝子を有する細胞に、野生型p51機能を提供する方法としてとらえることができる。かかる野生型p51遺伝子若しくはその遺伝子産物が本来的に有する正常な機能を細胞に供給すれば、受容細胞／標的細胞における新生物の増殖を抑制することができる。上記野生

型 p 5 1 遺伝子は、当該遺伝子を染色体外に維持するようなベクターまたはプラスミドを用いて目的の細胞に導入することができる。この場合、当該遺伝子は、染色体外から発現される。

- 5       このように変異 p 5 1 遺伝子を有する細胞に野生型 p 5 1 遺伝子を導入して正常な p 5 1 蛋白を発現させる場合、当該 p 5 1 遺伝子はその全長である必要はなく、例えば該遺伝子の所望機能と実質的に同質な機能を保持する限りにおいて、前記した改変体であっても、また特定
- 10       の機能を保持した一部配列からなる遺伝子を使用することもできる。後者の例としては細胞の非腫瘍的増殖（細胞増殖抑制）に必要な p 5 1 蛋白の一部をコードする遺伝子を挙げることができる。

- 野生型 p 5 1 遺伝子又はその一部分は、細胞に存在す
- 15       る内因的な突然変異 p 5 1 遺伝子との間で組換えが起こるように突然変異細胞に導入することが好ましい。このような組換えには、p 5 1 遺伝子突然変異が修正される二重組換えの発生が必要とされる。

- かかる組換え及び染色体外維持の双方のための所望遺
- 20       伝子の導入のためのベクターは、当該分野において既に知られており、本発明ではかかる既知のベクターのいずれもが使用できる。例えば、発現制御エレメントに連結

した p 5 1 遺伝子のコピーを含み、かつ目的の細胞内で当該遺伝子産物を発現できるウイルスベクターまたはプラスミドベクターを挙げることができる。かかるベクターとして、通常前述する発現用ベクターを利用することもできるが、好適には、例えば起源ベクターとして、米国特許第 5 2 5 2 4 7 9 号明細書及び P C T 国際公開 W O 9 3 / 0 7 2 8 2 号明細書に開示されたベクター（p W P - 7 A、p w P - 1 9、p W U - 1、p W P - 8 A、p W P - 2 1 及び／又は p R S V L など）又は p R C / C M V（Invitrogen社製）等を用いて、調製されたベクターを挙げることができる。より好ましくは、後述する各種ウイルス・ベクターである。

なお、遺伝子導入治療において用いられるベクターに使用されるプロモーターとしては、各種疾患の治療対象となる患部組織に固有のものを好適に利用することができる。

その具体例としては、例えば、肝臓に対しては、アルブミン、 $\alpha$ -フェトプロテイン、 $\alpha$ 1-アンチトリプシン、トランスフェリン、トランススチレンなどを例示できる。結腸に対しては、カルボン酸アンヒドラーゼ I、カルシノエングロゲンの抗原などを例示できる。子宮及び胎盤に対しては、エストロゲン、アロマターゼサイト

クローム P 4 5 0、コレステロール側鎖切断 P 4 5 0、  
1 7 アルファーヒドロキシラーゼ P 4 5 0などを例示で  
きる。

5 前立腺に対しては、前立腺抗原、g p 9 1 - フォック  
ス遺伝子、前立腺特異的カリクレインなどを例示できる。  
乳房に対しては、e r b - B 2、e r b - B 3、 $\beta$ -カ  
ゼイン、 $\beta$ -ラクトグロビン、乳漿蛋白質などを例示で  
きる。肺に対しては、活性剤蛋白質 C ウログロブリンな  
どを例示できる。皮膚に対しては、K - 1 4 - ケラチン、  
10 ヒトケラチン 1 又は 6、ロイクリンなどを例示できる。

脳に対しては、神経膠繊維質酸性蛋白質、成熟アスト  
ロサイト特異蛋白質、ミエリン、チロシンヒドロキシラ  
ーゼ膵臓ヴィリン、グルカゴン、ランゲルハンス島アミ  
ロイドポリペプチドなどを例示できる。甲状腺に対して  
15 は、チログロブリン、カルシトニンなどを例示できる。  
骨に対しては、 $\alpha$  1 コラーゲン、オステオカルシン、骨  
シアログリコプロティンなどを例示できる。腎臓に対し  
てはレニン、肝臓／骨／腎臓アルカリ性ホスホターゼ、  
エリスロポエチンなどを、膵臓に対しては、アミラーゼ、  
20 P A P 1などを例示できる。

なお遺伝子導入用ベクターの製造において、導入され  
る遺伝子（全部又は一部）は、本発明の p 5 1 遺伝子の



塩基配列情報に基づいて、前記の如く、一般的遺伝子工学的手法により容易に製造・取得することができる。

かかる遺伝子導入用ベクターの細胞への導入は、例えばエレクトロポレーション、リン酸カルシウム共沈法、  
5 ウイルス形質導入などを始めとする、細胞にDNAを導入する当該分野において既に知られている各種の方法に従って行うことができる。なお、野生型p51遺伝子で形質転換された細胞は、それ自体単離状態で癌の抑制ないしは癌転移の抑制のための医薬や、治療研究のための  
10 モデル系として利用することも可能である。

遺伝子治療においては、上記の遺伝子導入用ベクターは、患者の腫瘍部位に局所的にまたは全身的に注射投与することにより患者の腫瘍細胞内に導入することができる。この際全身的投与によれば、他の部位に転移し得る  
15 いずれの腫瘍細胞にも到達させることができる。形質導入された遺伝子が各標的腫瘍細胞の染色体内に恒久的に取り込まれない場合には、該投与を定期的に繰り返すことによって達成できる。

本発明の遺伝子治療方法は、前述する遺伝子導入用の  
20 材料（遺伝子導入用ベクター）を直接体内に投与するインビボ（in vivo）法と、患者の体内より一旦標的とする細胞を取り出して体外で遺伝子を導入して、その後、該

細胞を体内に戻すエキスビボ (ex vivo) 法の両方の方法を包含する。

またヒト p 5 1 遺伝子を直接細胞内に導入し、R N A 鎖を切断する活性分子であるリボザイムによる遺伝子治療も可能である。

後述する、本発明ヒト p 5 1 遺伝子若しくはその断片を含有する遺伝子導入用ベクター及び該ベクターによりヒト p 5 1 遺伝子が導入された細胞を有効成分とする本発明の遺伝子治療剤は、特に癌をその利用対象とするものであるが、上記の遺伝子治療 (処置) は、癌以外にも遺伝性疾患、A I D S のようなウイルス疾患の治療、並びに遺伝子標識をも目的として行うことができる。

また、遺伝子を導入する標的細胞は、遺伝子治療 (処置) の対象により適宜選択することができる。例えば、標的細胞として、癌細胞や腫瘍組織以外に、リンパ球、線維芽細胞、肝細胞、造血幹細胞、如き細胞などを挙げることができる。

上記遺伝子治療における遺伝子導入方法には、ウイルス的導入方法及び非ウイルス的導入方法が含まれる。

ウイルス的導入方法としては、例えば、ヒト p 5 1 遺伝子が正常細胞に発現する外来遺伝子であることに鑑みて、ベクターとしてレトロウイルスベクターを用いる方

法を挙げることができる。その他のウイルスベクターとしては、アデノウイルスベクター、H I V (human immunodeficiency virus) ベクター、アデノ随伴ウイルスベクター (A A V, adeno-associated virus)、ヘルペスウイルスベクター、単純ヘルペスウイルス (H S V) ベクター及びエプスタイン・バーウイルス (E B V, Epstein-Barr virus) ベクターなどがあげられる。

非ウイルス的な遺伝子導入方法としては、リン酸カルシウム共沈法；D N A を封入したリポソームと予め紫外線  
10 線で遺伝子を破壊した不活性化センダイウイルスを融合させて膜融合リポソームを作成し、細胞膜と直接融合させてD N A を細胞内に導入する膜融合リポソーム法 [Kato, K., et al., J. Biol. Chem., 266, 22071-22074 (1991)]；プラスミドD N A を金でコートして高圧放電によって物理的に細胞内にD N A を導入する方法 [Yang, N. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87, 9568-9572 (1990)]；プラスミドD N A を直接インビボで臓器や腫瘍に注入するネイキッド (naked) D N A 法 [Wolff, J. A., et al., Science, 247, 1465-1467 (1990)]；多重膜正電荷リポソームに包埋  
20 した遺伝子を細胞に導入するカチオニック・リポソーム法 [八木国夫, 医学のあゆみ, Vol. 175, No. 9, 635-637 (1995)]；特定細胞のみに遺伝子を導入し、他の細胞に入ら

ないようにするために、目的とする細胞に発現するレセプターに結合するリガンドをDNAと結合させてそれを投与するリガンド-DNA複合体法〔Frindeis, et al., Trends Biotechnol., 11, 202 (1993); Miller, et al., FA  
5 SEB J., 9, 190 (1995)〕などを使用することができる。

上記リガンド-DNA複合体法には、例えば肝細胞が発現するアシアロ糖蛋白レセプターをターゲットとしてアシアロ糖蛋白をリガンドとして用いる方法〔Wu, et al., J. Biol. Chem., 266, 14338 (1991); Ferkol, et al., FA  
10 SEB J., 7, 1081-1091 (1993)〕や、腫瘍細胞が強く発現しているトランスフェリン・レセプターを標的としてトランスフェリンをリガンドとして用いる方法〔Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 87, 3410 (1990)〕などが含まれる。

15     また本発明で用いられる遺伝子導入法は、上記の如き各種の生物学的及び物理学的な遺伝子導入法を適宜組合せたものであってもよい。該組合せによる方法としては、例えばあるサイズのプラスミドDNAをアデノウイルス・ヘキソン蛋白質に特異的なポリリジン抱合抗体と組合  
20     わせる方法を例示できる。該方法によれば、得られる複合体がアデノウイルスベクターに結合し、かくして得られる三分子複合体を細胞に感染させることにより本発明

遺伝子の導入を行い得る。この方法では、アデノウイルスベクターにカップリングしたDNAが損傷される前に、効率的な結合、内在化及びエンドソーム分解が可能となる。また、前記リポソーム／DNA複合体は、直接インビボにて遺伝子導入を媒介できる。

以下、具体的な本発明の遺伝子導入用ウイルスベクターの作成法並びに標的細胞又は標的組織への遺伝子導入法について述べる。

レトロウイルスベクター・システムは、ウイルスベクターとヘルパー細胞（パッケージング細胞）からなっている。ここでヘルパー細胞は、レトロウイルスの構造蛋白質 gag（ウイルス粒子内の構造蛋白質）、pol（逆転写酵素）、env（外被蛋白質）などの遺伝子を予め発現しているが、ウイルス粒子を生成していない細胞を言う。一方、ウイルスベクターは、パッケージングシグナルやLTR(long terminal repeats)を有しているが、ウイルス複製に必要な gag、pol、envなどの構造遺伝子を持っていない。パッケージングシグナルはウイルス粒子のアセンブリーの際にタグとなる配列で、選択遺伝子（neo, hyg）とクローニングサイトに組込まれた所望の導入遺伝子（p51遺伝子またはその断片）がウイルス遺伝子の代りに挿入される。ここで高力価の

ウイルス粒子を得るにはインサートを可能な限り短くし、パッケージングシグナルを *g a g* 遺伝子の一部を含め広くとることと、*g a g* 遺伝子の *A T G* を残さぬようにすることが重要である。

- 5      所望の *p 5 1* 遺伝子を組み込んだベクター *D N A* をヘルパー細胞に移入することによって、ヘルパー細胞が作っているウイルス構造蛋白質によりベクターゲノム *R N A* がパッケージされてウイルス粒子が形成され、分泌される。組換えウイルスとしてのウイルス粒子は、標的細胞に感染した後、ウイルスゲノム *R N A* から逆転写された *D N A* が細胞核に組み込まれ、ベクター内に挿入された遺伝子が発現する。
- 10

尚、所望の遺伝子の導入効率を上げる方法として、フィブロネクチンの細胞接着ドメインとヘパリン結合部位と接合セグメントとを含む断片を用いる方法〔Hanenberg, H., et al., Exp. Hemat., 23, 747 (1995)〕を採用することもできる。

15

なお、上記レトロウイルスベクター・システムにおいて用いられるベクターとしては、例えばマウスの白血病ウイルスを起源とするレトロウイルス〔McLachlin, J. R., et al., Proc. Natl. Acad. Res. Molec. Biol., 38, 91-135 (1990)〕を例示することができる。

20

アデノウイルスベクターを利用する方法につき詳述すれば、該アデノウイルスベクターの作成は、バークネル [Berkner, K. L., Curr. Topics Microbiol. Immunol., 158, 39-66 (1992)]、瀬戸口康弘ら [Setoguchi, Y., et al., Blood, 84, 2946-2953 (1994)]、鐘カ江裕美ら [実験医学, 12, 28-34 (1994)] 及びケナーら [Ketner, G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 91, 6186-6190 (1994)] の方法に準じて行うことができる。

例えば、非増殖性アデノウイルスベクターを作成するには、まずアデノウイルスの初期遺伝子の E 1 及び／又は E 3 遺伝子領域を除去する。次に、目的とする所望の外来遺伝子発現単位（目的とする導入遺伝子、本発明においては p 5 1 遺伝子、その遺伝子を転写するためのプロモーター、転写された遺伝子の安定性を賦与するポリ A から構成）及びアデノウイルスゲノム DNA の一部を含むプラスミドベクターと、アデノウイルスゲノムを含むプラスミドとを、例えば 2 9 3 細胞に同時にトランスフェクションする。この 2 者間で相同性組換えを起こさせて、遺伝子発現単位と E 1 とを置換することにより、所望の p 5 1 遺伝子を包含する本発明ベクターである非増殖性アデノウイルスベクターを作成することができる。また、コスミドベクターにアデノウイルスゲノム D

N Aを組み込んで、末端蛋白質を付加した3'側アデノウイルスベクターを作成することもできる。更に組換えアデノウイルスベクターの作成には、Y A Cベクターも利用可能である。

- 5        アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターの製造につき概略すると、A A Vはアデノウイルスの培養系に混入してくる小型のウイルスとして発見された。これには、ウイルス複製にヘルパーウイルスを必要とせず宿主細胞内で自律的に増殖するパルボウイルス属と、ヘルパーウイルスを必要とするディペンドウイルス属の存在が確認されている。該 A A Vは宿主域が広く、種々の細胞に感染するありふれたウイルスであり、ウイルスゲノムは大きさが4 6 8 0塩基の線状一本鎖D N Aからなり、その両端の1 4 5塩基がI T R (inverted terminal repeat)と
- 10        呼ばれる特徴的な配列を持って存在している。このI T Rの部分が複製開始点となり、プライマーの役割をなす。更にウイルス粒子へのパッケージングや宿主細胞の染色体D N Aへの組込みにも、該I T Rが必須となる。また、ウイルス蛋白質に関しては、ゲノムの左半分が非構造蛋白質、即ち複製や転写をつかさどる調節蛋白質のR e p
- 15        をコードしている。

組換えA A Vの作成は、A A Vが染色体D N Aに組み



込まれる性質を利用して行うことができ、かくして所望の遺伝子導入用ベクターが作成できる。この方法は、より詳しくは、まず野生型 A A V の 5' と 3' の両端の I T R を残し、その間に所望の導入用遺伝子（ヒト p 5 1 遺伝子）を挿入したプラスミド（A A V ベクタープラスミド）を作成する。一方、ウイルス複製やウイルス粒子の形成に必要とされるウイルス蛋白質は、別のヘルパープラスミドにより供給させる。この両者の間には共通の塩基配列が存在しないようにし、遺伝子組換えによる野生型ウイルスが出現しないようにする必要がある。その後、両者のプラスミドを例えば 2 9 3 細胞へのトランスフェクションにより導入し、さらにヘルパーウイルスとしてアデノウイルス（2 9 3 細胞を用いる場合は非増殖型のものでもよい）を感染させると、非増殖性の所望の組換え A A V が産生される。続いて、この組換え A A V は核内に存在するので、細胞を凍結融解して回収し、混入するアデノウイルスを 5 6 °C 加熱により失活させる。更に必要に応じて塩化セシウムを用いる超遠心法により組換え A A V を分離濃縮する。上記のようにして所望の遺伝子導入用の組換え A A V を得ることができる。

H I V ベクターの作成は、例えば島田らの方法に準じて行うことができる〔Shimada, T., et al., J.Clin.In

vest., 88, 1043-1047 (1991))。

H I V ウイルスは C D 4 をレセプターとしヘルパー T 細胞に特異的に感染するので、その利用によれば、ヒト C D 4 陽性細胞に特異的に遺伝子導入の可能な組織特異的遺伝子導入ベクターとしての H I V ベクターを作成す  
5 ることができる。該 H I V ベクターは、A I D S の遺伝子治療に最適といえる。

組換え H I V ベクターの作成は、例えばまずパッケージングプラスミドである C G P E を g a g 、 p o l 、 e  
10 n v の構造遺伝子とこれらの発現に必要な調節遺伝子 ( t a t 、 r e v など) をサイトメガロウイルス ( C M V ) のプロモーターとヒトグロビン遺伝子のポリ A シグナル ( p o l y A ) により発現するように作成する。次にベクタープラスミド H X N を、H I V の両 L T R の間に、標識遺伝子としてチミジンキナーゼ ( T K ) のプロモーターをも  
15 つバクテリアのネオマイシン耐性遺伝子 ( n e o R ) を挿入し、さらに基本となるプラスミドベクターに S V 4 0 の複製機転を挿入することにより、C O S 細胞内で効率よく増殖できるように構築できる。これらのパッケージ  
20 グプラスミドである C G P E とベクタープラスミド H X N を同時に C O S 細胞にトランスフェクションさせることにより大量の n e o R 遺伝子が組み込まれた所望の組

換えウイルスを作成し、培養培地中に放出させることができる。

E B V ベクターの製造は、例えば清水らの方法に準じて行うことができる〔清水則夫ら、細胞工学, 14(3), 2  
5 80-287 (1995)〕。

本発明の遺伝子導入用 E B V ベクターの製造につき概略すると、E B ウイルス (Epstein-Barr virus: EBV) は、1964年にエプスタイン (Epstein) らによりバーキット (Burkitt) リンパ腫由来の培養細胞より分離されたヘルペス科に属するウイルスである〔Kieff, E. and Liebowitz, D.: Virology, 2nd ed. Raven Press, New York, 1990, pp.1889-1920〕。該 E B V には細胞をトランスフォームする活性があるので、遺伝子導入用ベクターとするためには、このトランスフォーム活性を欠いたウイルスを  
10 調製しなければならない。これは次の如くして実施できる。

即ち、まず、所望の外来遺伝子を組み込む標的 D N A 近傍の E B V ゲノムをクローニングする。そこに外来遺伝子の D N A 断片と薬剤耐性遺伝子を組み込み、組換えウイルス作製用ベクターとする。次いで適当な制限酵素により切り出された組換えウイルス作製用ベクターを E B  
20 V 陽性 A k a t a 細胞にトランスフェクトする。相同組

換えにより生じた組換えウイルスは抗表面免疫グロブリン処理によるウイルス産生刺激により野生型 A k a t a E B V とともに回収できる。これを E B V 陰性 A k a t a 細胞に感染し、薬剤存在下で耐性株を選択することにより、野生型 E B V が共存しない所望の組換えウイルスのみが感染した A k a t a 細胞を得ることができる。さらに組換えウイルス感染 A k a t a 細胞にウイルス活性を誘導することにより、目的とする大量の組換えウイルスベクターを産生することができる。

10 組換えウイルスベクターを用いることなく所望の遺伝子を標的細胞に導入する、非ウイルスベクターの製造は、例えば膜融合リポソームによる遺伝子導入法により実施することができる。これは膜リポソーム（脂質二重膜からなる小胞）に細胞膜への融合活性をもたせることにより、リポソームの内容物を直接細胞内に導入する方法である。

上記膜融合リポソームによる遺伝子の導入は、例えば中西らの方法によって行うことができる [Nakanishi, M., et al., Exp. Cell Res., 159, 399-499 (1985); Nakanishi, M., et al., Gene introduction into animal tissues. In Trends and Future Perspectives in Peptide and Protein Drug Delivery (ed. by Lee, V.H. et al.), H

arwood Academic Publishers Gmbh. Amsterdam, 1995, pp. 337-349]。

以下、該膜融合リポソームによる遺伝子の導入法につき概略する。即ち、紫外線で遺伝子を不活性化したセン  
5     ダイウイルスと所望の遺伝子や蛋白質などの高分子物質  
を封入したリポソームを 37℃ で融合させる。この膜融合  
リポソームは、内側にリポソーム由来の空洞を、外側に  
ウイルス・エンベロープと同じスパイクがある疑似ウ  
イルスともよばれる構造を有している。更にショ糖密度  
10     勾配遠心法で精製後、標的とする培養細胞又は組織細胞  
に対して膜融合リポソームを 4℃ で吸着させる。次いで  
37℃ にするとリポソームの内容物が細胞に導入され、  
所望の遺伝子を標的細胞に導入できる。ここでリポソ  
ムとして用いられる脂質としては、50% (モル比) コレ  
15     ステロールとレシチン及び陰電荷をもつ合成リン脂質  
で、直径 300 nm の 1 枚膜リポソームを作製して使用  
するのが好ましい。

また、別のリポソームを用いて遺伝子を標的細胞に導  
入する方法としては、カチオニック・リポソームによる  
20     遺伝子導入法を挙げることができる。該方法は、八木ら  
の方法に準じて実施できる [Yagi, K., et al., B. B. R. C.,  
196, 1042-1048 (1993)]。この方法は、プラスミドも細胞

も負に荷電していることに着目して、リポソーム膜の内  
外両面に正の電荷を与え、静電気によりプラスミドの取  
り込みを増加させ、細胞との相互作用を高めようとする  
ものである。ここで用いられるリポソームは正荷電を有  
5 する多重膜の大きなリポソーム (multilamellar large  
vesicles: M L V) が有用であるが、大きな1枚膜リポ  
ソーム (large unilamellar vesicles: L U V) や小さ  
な1枚膜リポソーム (small unilamellar vesicles: S  
U V) を使用してプラスミドとの複合体を作製し、所望  
10 の遺伝子を導入することも可能である。

プラスミト包埋カチオニック M L V の調製法について  
概略すると、これはまず脂質 T M A G (N-( $\alpha$ -trimethy  
lammonioacetyl)-didodecyl-D-glutamate chloride)、D  
L P C (dilauroyl phosphatidylcholine) 及び D O P E  
15 (dioleoyl phosphatidylethanolamine) をモル比が 1 :  
2 : 2 となる割合で含むクロロホルム溶液 (脂質濃度と  
して 1 m M) を調製する。次いで総量 1  $\mu$  mol の脂質をス  
ピッツ型試験管に入れ、ロータリーエバポレーターでク  
ロロホルムを減圧除去して脂質薄膜を調製する。更に減  
20 圧下にクロロホルムを完全に除去し、乾燥させる。次い  
で 20  $\mu$  g の遺伝子導入用プラスミドを含む 0.5 ml のダ  
ルベッコのリン酸緩衝生理食塩液 - M g , C a 含有を添

加し、窒素ガス置換後、2分間ボルテックスミキサーにより攪拌して、所望の遺伝子を含むプラスミド包埋カチオニックMLV懸濁液を得ることができる。

上記で得られたプラスミド包埋カチオニックMLVを  
5 遺伝子治療剤として使用する一例としては、例えば発現  
目的遺伝子のcDNAを組み込んだ発現プラスミドを上  
記カチオニックMLVにDNA量として0.6  $\mu$ g、リポ  
ソーム脂質量として30 nmolになるように包埋し、これ  
を2  $\mu$ lのリン酸緩衝生理食塩液に懸濁させて患者より抽  
10 出した標的細胞または患者組織に対して隔日投与する方  
法が例示できる。

ところで、遺伝子治療とは「疾病の治療を目的として、  
遺伝子または遺伝子を導入した細胞をヒトの体内に投与  
すること」と日本国の厚生省ガイドラインに定義されて  
15 いる。しかしながら、本発明における遺伝子治療とは、  
該ガイドラインの定義に加えて、前記した標的細胞にヒ  
トp51遺伝子等の癌抑制遺伝子として特徴付けられる  
遺伝子を導入することによって癌を始めとする各種疾患  
の治療のみならず、更に標識となる遺伝子または標識と  
20 なる遺伝子を導入した細胞をヒト体内に導入することも  
含むものとする。

本発明の遺伝子治療において、所望遺伝子の標的細胞

または標的組織への導入方法には、代表的には2種類の方法が含まれる。

その第1法は、治療対象とする患者から標的細胞を採取した後、該細胞を体外で例えばインターロイキン-2 (IL-2)などの添加の下で培養し、レトロウイルスベクターに含まれる目的とするp51遺伝子を導入した後、得られる細胞を再移植する手法(ex vivo法)である。該方法はADA欠損症を始め、欠陥遺伝子によって発生する遺伝子病や癌、AIDSなどの治療に好適である。

10 第2法は、目的遺伝子(ヒトp51遺伝子)を直接患者の体内や腫瘍組織などの標的部位に注入する遺伝子直接導入法(直接法)である。

上記遺伝子治療の第1法は、より詳しくは、例えば次のようにして実施される。即ち、患者から採取した単核細胞を血液分離装置を用いて単球から分取し、分取細胞をIL-2の存在下にAIM-V培地などの適当な培地で72時間程度培養し、導入すべき遺伝子(ヒトp51遺伝子)を含有するベクターを加える。遺伝子の導入効率をあげるために、プロタミン存在下に32℃で1時間、20 2500回転にて遠心分離した後、37℃で10%炭酸ガス条件下で24時間培養してもよい。この操作を数回繰り返した後、更にIL-2存在下にAIM-V培地などで



4 8 時間培養し、細胞を生理食塩水で洗浄し、生細胞数を算定し、遺伝子導入効率を前記 *in situ* PCR や、例えば所望の対象が酵素活性であればその活性の程度を測定することにより、目的遺伝子導入効果を確認する。

- 5        また、培養細胞中の細菌・真菌培養、マイコプラズマの感染の有無、エンドトキシンの検索などの安全度のチェックを行い、安全性を確認した後、予測される効果用量の遺伝子（ヒト p 5 1 遺伝子）が導入された培養細胞を患者に点滴静注により戻す。かかる方法を例えば数週
- 10      間から数カ月間隔で繰り返すことにより遺伝子治療が施される。

ここでウイルスベクターの投与量は、導入する標的細胞により適宜選択される。通常、ウイルス価として、例えば標的細胞  $1 \times 10^8$  細胞に対して  $1 \times 10^3$  c f u から  $1 \times 10^8$  c f u の範囲となる投与量を採用することが好ましい。

15

上記第 1 法の別法として、目的遺伝子（ヒト p 5 1 遺伝子）を含有するレトロウイルスベクターを含有するウイルス産生細胞と例えば患者の細胞とを共培養して、目的とする細胞へ遺伝子（ヒト p 5 1 遺伝子）を導入する方法を採用することもできる。

20

遺伝子治療の第 2 法（直接法）の実施に当たっては、

特に体外における予備実験によって、遺伝子導入法によって、実際に目的遺伝子（ヒト p 5 1 遺伝子）が導入されるか否かを、予めベクター遺伝子 c D N A の P C R 法による検索や in situ P C R 法によって確認するか、或いは目的遺伝子（ヒト p 5 1 遺伝子）の導入に基づく所望の治療効果である特異的活性の上昇や標的細胞の増殖増加や増殖抑制などを確認することが望ましい。また、ウイルスベクターを用いる場合は、増殖性レトロウイルスなどの検索を P C R 法で行うか、逆転写酵素活性を測定するか、或は膜蛋白 (env) 遺伝子を P C R 法でモニターするなどにより、遺伝子治療に際して遺伝子導入による安全性を確認することが重要であることはいうまでもない。

本発明の遺伝子治療法において、特に癌や悪性腫瘍を対象とする場合は、患者から癌細胞を採取後、酵素処理などを施して培養細胞を樹立した後、例えばレトロウイルスにて所望の遺伝子を標的とする癌細胞に導入し、G 4 1 8 細胞にてスクリーニングした後、I L - 1 2 などの発現量を測定 (in vivo) 測定し、次いで放射線処理を行行し、患者腫瘍内または傍腫瘍に接種する癌治療法を一例として挙げることができる。

ヘルペス単体ウイルスーチミジンキナーゼ (H S V -

T K) 遺伝子は、特にヌクレオチドアナログであるガンシクロビル (G C V) を毒性中間体に転換して、分裂性細胞の死をもたらすことが報告され、該遺伝子を腫瘍に対して用いる遺伝子治療が知られている [米国特許第 5  
5 6 3 1 2 3 6 号明細書 ; 特表平 9 - 5 0 4 7 8 4 号公報参照]。該方法は自殺遺伝子といわれる前記 H S V - T K 遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクター産生細胞を注入して 1 週間後に抗ウイルス剤として知られている G C V を投与すると、遺伝子導入細胞では G C V がリン酸化を受けて活性化されて遺伝子導入細胞を自殺に導くと同時に、ギャップ・ジャンクションを介した細胞接触により、周囲の非導入細胞にも細胞死をもたらすことを利用した遺伝子治療法である。本発明の遺伝子導入ベクターもしくは該ベクターを含む細胞は、上記遺伝子療法にも  
10 15 も利用することができる。

別の遺伝子治療法としては、標的細胞表面に結合する抗体を結合させた遺伝子 (ヒト p 5 1 遺伝子) 含有イムノリポゾームを作製し、包埋した c D N A を選択的に効率よく標的細胞に導入させる方法があげられる。また、  
20 前記したサイトカイン遺伝子含有ウイルスベクターと自殺遺伝子含有アデノウイルスとを同時に投与する結合遺伝子療法も可能である。これらの方法は当該分野におけ

る当業者の技術レベルある。

(7) 遺伝子治療用医薬組成物

本発明はまた、本発明の遺伝子導入用ベクター又は目的遺伝子（ヒト p 5 1 遺伝子など）が導入された細胞を  
5 活性成分とし、それを薬学的有効量、適当な無毒性医薬担体ないしは希釈剤と共に含有する医薬組成物又は医薬製剤（遺伝子治療剤）を提供する。

本発明の医薬組成物（医薬製剤）に利用できる医薬担  
10 体としては、製剤の使用形態に応じて通常使用される、充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤などの希釈剤ないし賦形剤などを例示でき、これらは得られる製剤の投与単位形態に応じて適宜選択使用できる。

15 本発明医薬製剤の投与単位形態としては、前記した p 5 1 蛋白製剤の製剤例を同様に挙げることができ、治療目的に応じて各種の形態から適宜選択することができる。

例えば、本発明の遺伝子導入用ベクターを含む医薬製  
20 剤は、該ベクターをリポソームに包埋された形態あるいは所望の遺伝子が包含されるレトロウイルスベクターを含むウイルスによって感染された培養細胞の形態に調製

される。

これらは、リン酸緩衝生理食塩液（pH 7.4）、リンゲル液、細胞内組成液用注射剤中に配合した形態などに調製することもでき、またプロタミンなどの遺伝子導入  
5 効率を高める物質と共に投与されるような形態に調製することもできる。

上記医薬製剤の投与方法は、特に制限がなく、各種製剤形態、患者の年齢、性別その他の条件、疾患の程度などに応じて決定される。

10 上記医薬製剤中に含有されるべき本発明有効成分の量及びその投与量は、特に限定されず、所望の治療効果、投与方法、治療期間、患者の年齢、性別その他の条件などに応じて広範囲より適宜選択される。

一般には、医薬製剤としての所望遺伝子含有レトロウイルスベクターの投与量は、1日当たり体重1kg当たり、  
15 例えばレトロウイルスの力価として約 $1 \times 10^3$  pfuから $1 \times 10^{15}$  pfu程度とするのがよい。

また所望の導入用遺伝子が導入された細胞の場合は、  
1  $1 \times 10^4$ 細胞/bodyから $1 \times 10^{15}$ 細胞/body程度の範囲  
20 範囲から選ばれるのが適当である。

該製剤は1日に1～数回に分けて投与することもでき、1から数週間間隔で間欠的に投与することもできる。

尚、好ましくは、プロタミンなど遺伝子導入効率を高める物質又はこれを含む製剤と併用投与することができる。

本発明に従う遺伝子治療を癌の治療に適用する場合は、前記した種々の遺伝子治療を適宜組合わせて行う（結合遺伝子治療）こともでき、前記した遺伝子治療に、従来の癌化学療法、放射線療法、免疫療法などを組合わせて行うこともできる。さらに本発明の遺伝子治療は、その安全性を含めて、N I Hのガイドラインを参考にして実施することができる〔Recombinant DNA Advisory Committee, Human Gene Therapy, 4, 365-389 (1993)〕。

#### （８）腫瘍診断への応用

本発明によれば、人の細胞の腫瘍形成を促す p 5 1 変異遺伝子の存在を検出するために、血液又は血清のごとき生物学的試料を調製し、所望により核酸を抽出し、p 5 1 の感受性変異遺伝子が存在する否かについて分析することが可能である。また、本発明によれば細胞又は組織における新生物、悪性の前駆障害への進行、または予後指標としての存在を検出するためには、障害を有する生物学的な試料を調製し、p 5 1 の新生物変異遺伝子が存在するか否かについて分析できる。この方法を用いるこ

とにより細胞又は組織における新生物、悪性の前駆障害への進行、または予後指標としての存在を検出することが可能となり、これらの診断、例えば癌の診断並びに癌治療効果の判定並びに予後の予測が可能となる。

- 5       該検出方法は、例えば、予め腫瘍を有する患者サンプルから得られた p 5 1 変異遺伝子に関する情報を基に、例えば p 5 1 遺伝子の変異部位及びその変異配列情報に基づき、該変異 D N A 断片を作成し、変異遺伝子のスクリーニング及び／又はその増幅に用いられるように設計
- 10       される。より具体的には、例えばブランクハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション、サザンブロット法、ノーザンブロット法等において用いられるプローブ、P C R により変異 D N A 断片を増幅するためのプローブを作成することができる。その為にはまず変
- 15       異と同じ配列を持つプライマーを作成し、スクリーニング用プローブとして用い、生物学的試料（核酸試料）と反応させることにより、当該 p 5 1 遺伝子の変異配列を有する遺伝子の存在を確認することが出来る。該核酸試料は、標的配列の検出を容易にするために、例えば変性、
- 20       制限消化、電気泳動またはドットブロッキング等の種々の方法を用いて調製することができる。

前記スクリーニング方法としては、特に P C R 法を用

いるのが感度の点から好ましく、該方法は、p 5 1 変異断片をプライマーとして用いる方法であればとくに制限されず、従来公知の方法 (Science, 230, 1350-1354(1985)) や新たに開発された、或いは将来使用される P C R 変法 (榎 佳之、ほか編、羊土社、実験医学、増刊, 8(9)(1990); 蛋白質・核酸・酵素、臨時増刊、共立出版(株), 35(17)(1990)) のいずれも利用することが可能である。

プライマーとして使用される D N A 断片は、化学合成したオリゴ D N A であり、これらオリゴ D N A の合成は自動 D N A 合成装置等、例えば D N A 合成装置 (PharmaciaLKB Gene Assembler Plus: ファルマシア社製) を使用して合成することができる。合成されるプライマー (センスプライマー又はアンチセンスプライマー) の長さは約 10 ~ 30 ヌクレオチド程度が好ましく例示できる。上記スクリーニングに用いられるプローブは、通常は標識したプローブを用いるが、非標識であってもよく、直接的又は間接的に標識したリガンドとの特異的結合によって検出してもよい。適当な標識、並びにプローブ及びリガンドを標識する方法は、本発明の技術分野で知られており、ニック・トランスレーション、ランダム・プライミング又はキナーゼ処理のような、既知の方法によって取り込ませることができる放射性標識、ビオチン、蛍光



性基、化学発光基、酵素、抗体などがこれらの技術に含まれる。

検出のために用いるPCR法としては、例えばRT-PCR法が例示されるが、当該分野で用いられる種々の  
5 変法を適応することが出来る。

PCR法を用いて、野生型p51遺伝子及び／又は変異p51遺伝子の存在とこれら遺伝子のDNAを定量することも可能である。該方法としては、MSSA法の如き競合的定量法(Kinoshita, M., et al., CCA, 228, 83-  
10 90 (1994))、または一本鎖DNAの高次構造の変化に伴う移動度の変化を利用した突然変異検出法として知られるPCR-SSCP法(Orita, M., et al., Genomics, 5, 874-879 (1989))を例示できる。

上記例示された分析法において、例えばp51の変異  
15 (例えば癌患者などから得られた部位変異情報を基にした変異配列)を含む1乃至は複数のプライマーを調製し、生物学的試料から得られたDNAとハイブリダイズさせた後、PCR増幅断片とp51野生株のDNA断片をスタンダードのSSCP解析により測定された移動度及び  
20 ピーク領域と前記プライマーにより増幅した増幅産物としての被検試料における移動度及びピーク領域とを対比することにより、p51の特定領域における変異の検出

と当該変異産物の定量とを同時に行うことが可能となる。

- 前記において、測定対象となる変異 p 5 1 遺伝子を含む被検試料は、該遺伝子を含むものであれば特に限定なく使用でき、例えば、血液、血清、尿、切除組織などの生体生物材料を例示できる。変異 p 5 1 遺伝子は、これら被検試料より常法に従い抽出、精製及び調製できる。従って、本発明にかかる上記スタンダードとしての D N A 断片について、予め測定された移動度と p 5 1 変異プライマー対を用いる被検試料中の p 5 1 D N A の P C R 増幅工程における増副産物としての被検試料における移動度とを対比することにより、p 5 1 D N A の特定領域における変異の検出を簡便かつ良好に行うことができる。
- さらに既知段階量に設定したスタンダードを用いた場合には、そのピーク領域と前記方法の p 5 1 変異プライマー対を用いる被検試料中の p 5 1 D N A の P C R 増幅工程における増副産物としての被検試料におけるピーク領域との対比により、被検試料中の p 5 1 変異体の定量を同時に行うことができる。該方法において使用されるプライマー対、スタンダード、P C R - S S C P 解析及びその検出手段等の改変等は、この分野の当業者にとり

適宜なし得るものであり、本発明は勿論それらの改変等をも野生 p 5 1 遺伝子及び変異 p 5 1 遺伝子の配列を用いる限り包含されるものである。

上記本発明の測定方法を、より具体的に例示すると、

5 まず癌患者血清からアルカリ、酸処理等の常法によって DNA を抽出し、得られた DNA 溶液に、配列番号 1 に示される塩基配列 (145-1488) の一部を含む特定の長さからなるマイナス鎖部分配列、及び蛍光標識した該塩基配列 (145-1488) の一部配列を含む、特定長さからなるプラス鎖部分配列のプライマー対とを耐熱性 DNA ポリメラーゼと作用させて、標識された DNA 断片を増幅させる。

10 一方では、癌患者などから得られた p 5 1 部位変異情報を基にして化学合成した変異配列を含む 1 又は複数の DNA 断片を、プラスミドベクターにそれぞれ組み込み、

15 大腸菌に形質転換して大量培養後、精製した組換え体プラスミドを用いて、例えば  $10^3$  コピー、 $10^4$  コピー、 $10^5$  コピー、 $10^6$  コピー、 $10^7$  コピー及び、 $10^8$  コピーのスタンダードを調製し、これに上記の塩基配列 (145-1488) の一部の特定配列を含むマイナス鎖部分配列及び

20 蛍光標識した塩基配列 (145-1488) の一部の特定配列を含むプラス鎖部分配列のプライマー対とを耐熱性 DNA ポリメラーゼと作用させて、標識された DNA 断片を増

幅させる。前記で増幅されたDNA溶液を、95℃程度で5分間程度加熱し、直ちに水中で冷却し、ALF自動シーケンサー(ファルマシア社製)等の自動シーケンサーによるSSCP解析を行うことにより、蛍光ピーク  
5 を検出することができる。尚、該SSCP解析における泳動は、好ましくは約30℃±1℃にて行われる。

かくして患者血清より得られたDNAのピーク(移動度)をスタンダードのピーク(移動度)と比較し、その泳動時間からスタンダードと一致するピークを確認すること  
10 により、患者のp51の変異のタイプ(種類)を判定することが出来る。またスタンダードのピーク領域を算出し、これより標準曲線を作成することにより、患者DNAにおけるピーク領域の計算値より、当該p51DNAの定量を行うことができる。

15

#### (9) p51遺伝子の変異検出法、及び各種測定法

従って、本発明はかかる測定により、被検試料中のp51DNAの特定領域の変異の検出とその定量方法を同時に行う簡便な検査方法をも提供するものである。

20 また、本発明の測定方法は、試料中の野生型p51遺伝子及び変異p51遺伝子の検出のための試薬キットを利用することによって、簡便に実施することができる。

故に本発明は上記野生型 p 5 1 D N A 断片及び変異 p 5 1 D N A 断片を含有することを特徴とする野生型 p 5 1 及び変異 p 5 1 の検出用試薬キットが提供される。

該試薬キットは、少なくとも配列番号 2 に示される塩基配列(145-1488)もしくはその相補的塩基配列の一部または全てにハイブリダイズする D N A 断片、又は塩基配列(145-1488)の変異配列もしくはその変異配列に相補的塩基配列の一部又は全てにハイブリダイズする D N A 断片を必須構成成分として含んでいれば、他の成分として、  
10 標識剤、P C R 法に必要な試薬（例えば、T a q D N A ポリメラーゼ、デオキシヌクレオチド三リン酸、プライマー等）が含まれていても良い。また、上記配列番号 2 に示される塩基配列(145-1488)に代えて、配列番号 5 に示される塩基配列(145-2067)を用いることもできる。  
15 標識剤としては、放射性同位元素又は蛍光物質等の化学修飾物質等が挙げられるが、D N A 断片自身が予め該標識剤でコンジュゲートされていてもよい。更に当該試薬キットには、測定の実施の便益のために適当な反応希釈液、標準抗体、緩衝液、洗浄剤、反応停止液等が含まれていてもよい。  
20

更に本発明は、前記測定方法を用いる癌の診断方法及び該方法に用いる診断剤並びに診断用キットをも提供す

るものである。

また、前記方法を用いることにより、被検試料中から得られた p 5 1 変異配列を直接的若しくは間接的に配列決定することにより、野生型 p 5 1 と相同性の高い相同物である新たな p 5 1 遺伝子に関連する関連遺伝子を見出すことができる。

従って、本発明はかかる測定と被検試料中の変異 p 5 1 DNA の配列決定により、被検試料中のヒト p 5 1 遺伝子に関連する関連遺伝子のスクリーニング方法をも提供するものである。

また、本発明の配列番号 1 で示されるヒト p 5 1 A 遺伝子でコードされる蛋白質、又は配列番号 1 において 1 若しくは数個乃至複数のアミノ酸が欠失、置換、又は付加されたアミノ酸配列、又はこれらの断片から蛋白を合成し、若しくは該蛋白に対する抗体を合成することによって、野生型 p 5 1 及び／または変異型 p 5 1 の測定が可能となる。また、上記ヒト p 5 1 A 遺伝子でコードされる蛋白質に代えて、配列番号 4 で示されるヒト p 5 1 B 遺伝子でコードされる蛋白質を用いることもできる。

従って、本発明は、野生型 p 5 1 及び／または変異型 p 5 1 の抗体測定法、抗原測定法を提供するものである。該測定法によって新生物状態の障害の程度、或いは悪性

腫瘍の悪性度を野生性型 p 5 1 蛋白の変化に基づいて検出することも可能である。かかる変化は、この分野における前記慣用技術による p 5 1 配列分析によっても決定できるが、更に好ましくは、抗体(ポリクローナル又はモノクローナル抗体)を用いて、p 5 1 蛋白中の相違、又は p 5 1 蛋白の有無を検出することが出来る。本発明の測定法の具体的な例示としては、p 5 1 抗体は、血液・血清などのヒトより採取した生体材料試料含有溶液から p 5 1 蛋白質を免疫沈降し、かつポリアクリルアミドゲルのウェスタン・ブロット又はイムノブロット上で p 5 1 蛋白質と反応することができる。また、p 5 1 抗体は免疫組織化学的技術を用いてパラフィン又は凍結組織切片中の p 5 1 蛋白を検出することが出来る。抗体産生技術及び精製する技術は当該分野においてよく知られているので、これらの技術を適宜選択することができる。

野生型 p 5 1 又はその突然変異体を検出する方法に関連するより好ましい具体例には、モノクローナル抗体及び／又は、ポリクローナル抗体を用いるサンドイッチ法を含む、酵素結合イムノソルベントアッセイ(E L I S A)、放射線免疫検定法(R I A)、免疫放射線検定法(I R M A)、及び免疫酵素法(I E M A)が含まれる。

また、本発明は、p 5 1 蛋白に対する p 5 1 結合活性

を有す細胞膜画分又は細胞表面上に存在する p 5 1 レセプターをも提供することが可能である。該 p 5 1 レセプターの取得は、細胞膜画分を含む生体材料試料中において標識した p 5 1 蛋白をコンジュゲートさせ、p 5 1 結合反応物を抽出・単離、精製し、単離物のアミノ酸配列を特定することによって達成され、該 p 5 1 レセプター蛋白の取得並びに配列決定は、この分野の当業者には容易に達成できる。

#### 10 (10) 薬剤スクリーニングへの応用

また本発明は、p 5 1 レセプターポリペプチド又はその結合断片を種々の薬剤のいずれかをスクリーニングする技術に用いることによって、化合物(p 5 1 レセプター反応物：化合物は低分子化合物、高分子化合物、蛋白質、蛋白質部分断片、抗原、又は抗体など言う)をスクリーニングすることに利用可能である。好ましくは、p 5 1 レセプターを利用する。かかるスクリーニング試験に用いる p 5 1 レセプターポリペプチド又は、その断片は、固体支持体に付着するか、又は細胞表面に運ばれている溶液中の遊離物であってもよい。薬剤スクリーニングの一例としては、例えば、ポリペプチド又はその断片を発現する組換えポリペプチドで安定して形質転換した原核生



物又は真核生物の宿主細胞を、好ましくは競合的結合アッセイにおいて利用することができる。また遊離の又は固定した形態のかかる細胞を標準結合アッセイに用いることも出来る。より具体的には、p 5 1 レセプターポリペプチド又はその断片と試験する物質との間の複合体の形成を測定し、p 5 1 レセプターポリペプチド又はその断片と p 5 1 ポリペプチド又はその断片との間の複合体の形成が試験する物質によって阻害される程度を検出することによって化合物をスクリーニングすることが可能である。

かくして、本発明は、当該分野で既知の方法によって、かかる物質と p 5 1 レセプターポリペプチド又は、その断片とを接触させ、次いで、該物質と p 5 1 レセプターポリペプチド又は、その断片との間の複合体の存在、または p 5 1 レセプターポリペプチド又は、その断片とリガンドとの間の複合体の存在について測定することの特徴とする薬剤のスクリーニング方法を提供することができる。さらに、p 5 1 レセプター活性を測定してかかる物質が p 5 1 レセプターを阻害でき、かくして上記定義された p 5 1 の活性、例えば細胞周期を調節できるかどうか、或いはアポトーシス誘導の調節ができるかどうか判断する。かかる競合結合アッセイにおいて、より具

- 体的には、p 5 1 レセプターポリペプチド又は、その断片を標識する。遊離の p 5 1 レセプターポリペプチド又は、その断片を、蛋白質：蛋白質複合体で存在するものから分離し、遊離（複合体未形成）標識の量は、各々、
- 5 試験される因子の p 5 1 レセプターに対する結合または p 5 1 レセプター：p 5 1 ポリペプチド結合の阻害の尺度となる。p 5 1 ポリペプチドの小さなペプチド（ペプチド疑似体）をこのように分析し、p 5 1 レセプター阻害活性を有するものを測定できる。
- 10 本発明において、薬剤スクリーニングのための他の方法は、p 5 1 レセプターポリペプチドに対して適当な結合親和性を有する化合物についてのスクリーニング法であって、該略すると、多数の異なるペプチド試験化合物をプラスチックのピンまたは他の物質の表面のごとき固
- 15 体支持体上で合成し、次いでペプチド試験化合物を p 5 1 レセプターポリペプチドと反応させ、洗浄する。次いで既知の方法を用いて反応結合 p 5 1 レセプターポリペプチドを検出する方法も例示できる（P C T 特許公開番号：W O 8 4 - 0 3 5 6 4 号）。精製された p 5 1 レセプ
- 20 ターは、直接、前記の薬剤スクリーニング技術で使用するプレート上に被覆することができる。しかしながら、ポリペプチドに対する非 - 中和抗体を用いて抗体を補足

し、p 5 1 レセプターポリペプチドを固相上に固定することができる。さらに本発明は、競合薬剤スクリーニングアッセイの使用をも目的とし、p 5 1 レセプターポリペプチド又は、その断片に対する結合性につき、p 5 1  
5 レセプターポリペプチドに特異的に結合できる中和抗体と試験化合物とを競合させる。抗体による該競合によって、p 5 1 レセプターポリペプチドの 1 又はそれ以上の抗原決定部位を有するいずれのペプチドの存在をも検出することが可能である。

10 また、薬剤スクリーニングに関し、さらなる方法としては、非機能性 p 5 1 遺伝子を含有する宿主真核細胞系または細胞の使用が挙げられる。宿主細胞系または細胞を薬剤化合物の存在下において一定期間増殖させた後、  
15 該宿主細胞の増殖速度を測定して、該化合物が例えば、アポトーシスや細胞周期を調節できるかどうかを確認する。増殖速度を測定する 1 手段として、p 5 1 レセプターの生物活性を測定することも可能である。

また本発明によれば、より活性又は安定した形態の p 5 1 ポリペプチド誘導体、または、例えば、イン・ビボ  
20 (in vivo)で p 5 1 ポリペプチドの機能を高めるか若しくは妨害する薬剤を開発するために、それらが相互作用する目的の生物学的に活性なポリペプチド又は構造アナロ

5      グ、例えば p 5 1 アゴニスト、p 5 1 アンタゴニスト、  
p 5 1 インヒビター、等を作製することが可能である。  
前記構造アナログは例えば p 5 1 と他の蛋白の複合体の  
三次元構造を X 線結晶学、コンピューター・モデリング  
又は、これらの組み合わせた方法によって決定すること  
が出来る。また、構造アナログの構造に関する情報は、  
相同性蛋白質の構造に基づく蛋白質のモデリングによっ  
て得ることも可能である。

10      また上記より活性又は安定した形態の p 5 1 ポリペプ  
チド誘導体を得る方法としては、例えばアラニン・スキ  
ャンによって分析することが可能である。該方法はアミ  
ノ酸残基をAlaで置換し、ペプチドの活性に対するその影  
響を測定する方法でペプチドの各アミノ酸残基をこのよ  
うに分析し、当該ペプチドの活性や安定性に重要な領域  
15      を決定する方法である。該方法によって、より活性な、  
または安定な p 5 1 誘導体を設計することができる。

20      また機能性アッセイによって選択した標的－特異的抗  
体を単離し、次いでその結晶構造を解析することも可能  
である。原則として、このアプローチにより、続く薬剤  
の設計の基本となるファーマコア(pharmacore)を得る。  
機能性の薬理学的に活性な抗体に対する抗－イディオタ  
イプ抗体を生成させることによって、化学的または生物

学的に生成したペプチドのバンクよりペプチドを同定したり単離したりすることが可能である。故に選択されたペプチドもファーマコアとして作用すると予測される。

かくして、改善された p 5 1 活性、若しくは安定性、  
5 または p 5 1 活性のインヒビター、アゴニスト、アンタゴニスト、などとしての作用を有する薬剤を設計・開発することが出来る。

クローン化 p 5 1 配列によって、十分な量の p 5 1 ポリペプチドを入手して、X線結晶学のような分析研究をも行うことができる。さらに、本発明の配列番号 1 に示  
10 されるアミノ酸配列よりなる p 5 1 蛋白の提供により、X線結晶学に代えるか、または加えて、コンピューターモデリング技術に適応可能である。

また本発明によれば、ヒト p 5 1 遺伝子含有ノックアウト・マウス(変異マウス)を作成することによってヒト p  
15 5 1 遺伝子配列のどの部位が生体内で上記したような多様な p 5 1 活性に影響を与えるかどうか、即ち p 5 1 遺伝子産物、並びに改変 p 5 1 遺伝子産物が生体内でどのような機能を有するかを確認することができる。

20 該方法は、遺伝子の相同組換えを利用して、生物の遺伝情報を意図的に修飾する技術であり、マウスの胚性幹細胞(E S 細胞)を用いた方法を例示できる (Capecocchi,

M. R., Science, 244, 1288-1292 (1989))。

尚、上記変異マウスの作製方法はこの分野の当業者にとって既に通常の技術であり、この改変技術(野田哲生編、実験医学, 増刊, 14 (20) (1996)、羊土社)に、本発明のヒト野性型 p 5 1 遺伝子及び変異 p 5 1 遺伝子を適応して容易に変異マウスを作製し得る。従って前記技術の適応により、改善された p 5 1 活性、若しくは安定性、または p 5 1 活性のインヒビター、アゴニスト、アンタゴニスト、等としての作用を有する薬剤を設計・開発することが出来る。

なお、本発明には、以下のものが含まれる：

1. p 5 1 遺伝子を腫瘍細胞に移すことからなる腫瘍形成抑制方法。
- 15 2. p 5 1 蛋白を腫瘍細胞に移すことからなる腫瘍形成抑制方法。
3. p 5 1 遺伝子又はその同効物、及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。
4. p 5 1 蛋白又はその同効物、及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。
- 20 5. p 5 1 遺伝子又はその同効物を有効成分とする遺伝子治療剤。

6. p 5 1 遺伝子又はその同効物を含有する癌診断剤。
7. p 5 1 蛋白又はその同効物を含有する癌診断剤。
8. p 5 1 遺伝子又はその同効物を用いる p 5 1 又は p 5 3 関連遺伝子のスクリーニング方法。
- 5 9. p 5 1 遺伝子又はその同効物を用いて、細胞の腫瘍形成を抑制作用物をスクリーニングする方法。
- 10 10. p 5 1 遺伝子またはその同効物を用いる p 5 1 遺伝子の誘導及び／又は阻害物質のスクリーニング方法。
11. 上記スクリーニング方法より収得される p 5 1 遺伝子の誘導及び／又は阻害物質の p 5 1 遺伝子発現異常に起因する疾患治療への利用。

### 発明を実施するための最良の形態

- 以下、本発明を更に詳しく説明するため実施例及び実験例を挙げる。ただし、本発明はかかる実施例及び実験例により何ら限定されるものではない。

#### 実施例 1 ヒト p 5 1 遺伝子の単離

- (1) ヒト p 5 1 遺伝子のクローニング及び D N A シークエンシング
- 20 (a) 本発明者らは、次に掲げる p73-F1 センスプライマー及び p73-R1 アンチセンスプライマーを用いて P C R を行い増幅し、次いで p73-F2 センスプライマー及び p73-R2

アンチセンスプライマーで N e s t して増幅を行った。

p73-F1:5' -TA(CGT)GCA(CGT)AAA(G)ACA(CGT)TGC(T)CC-3'

p73-R1:3' -TGC(T)GCA(CGT)TGC(T)CCA(CGT)GGA(CGT)A(C)G-5'

p73-F2:5' -TA(CGT)ATA(CT)A(C)GA(CGT)GTA(CGT)GAA(G)GG-3'

5 p73-R2:3' -ATGAAC(T)A(C)GA(CGT)A(C)GA(CGT)CCA(CGT)AT-5'

具体的には、ヒト骨格筋ポリ A + R N A (クローンテック社製) よりランダムプライマーおよびオリゴ d T プライマーを用いて c D N A を合成し、 $\lambda$  ZipLox (ギブコ  
10 BRL社製) をベクターとして構築した約  $10^7$  プラークからなる c D N A ライブラリーを増幅し、D N A を抽出した。その c D N A 0.2  $\mu$  g を鋳型として上記プライマー p73-F1 及び p73-R1 を用いて Tag Polymerase (ギブコ B R L 社製) の説明書に従って、94  $^{\circ}$ C で 30 秒、45  $^{\circ}$ C  
15 で 30 秒、72  $^{\circ}$ C で 30 秒を 25 サイクルで増幅し、次いでその 100 分の 1 を鋳型として上記プライマー p73-F2 及び p73-R2 を用いて同様の反応によって増幅した。

p 5 3 遺伝子の構造から推測される 172 b p のバンドが得られたので、そのバンドの制限酵素地図を作成したところ、p 5 3 遺伝子以外の遺伝子があることが判明  
20 した。そのバンドを p G E M 7 (Promega 社製) にサブクローニングし、A B I 377 自動シーケンサー (A B I 社



製)を用いて、常法に従って塩基配列を決定したところ、p 5 3 遺伝子に類似するものの、異なる新規塩基配列を有する新規遺伝子に由来するDNA断片であった。

5       なお別途、他の臓器(脳等)由来のcDNAライブラリーに対して、同様の解析を行ったところ、更に別個のp 5 3 遺伝子に類似性を有する新規遺伝子由来のDNA断片が検出されたが、それはp 7 3 遺伝子由来のものであった。

      このサブクローンされたDNA断片を切り出し、BcaB  
10   est labeling kit(宝酒造製)を用いて標識プローブを作成した。オリゴdTプライマーのみを用いる以外は上記cDNAライブラリーと同様にして構築した未増幅のライブラリー $2.4 \times 10^6$ プラークをプラークハイブリダイゼーションによってスクリーニングした結果、8個の  
15   ポジティブクローンが得られた。 $\lambda$  ZipLoxはCre-LoxPの系を用いて、容易にプラスミドに変換できるので、変換プラスミドをLICOR社の自動シーケンサーとABI  
      I 3 7 7 自動シーケンサー(ABI社)を用いて、常法に従って塩基配列を決定した。

20       次いで、得られた遺伝子の塩基配列とp 5 3 遺伝子及びp 7 3 遺伝子の塩基配列との相同性を、GCGソフトウェア(ウィスコンシン・配列分析パッケージ、ジェネ

ティクス・コンピューター・グループ製)を使用するFASTAプログラムを用いて(Person, W. R. and Lipman, D. J., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 85, 1435-1441 (1988))、探索した。

- 5       かかる相同性検索の結果、上記の方法によって選択され、塩基配列が決定されたクローンのうち2つがp 5 3遺伝子およびp 7 3遺伝子と高い相同性を有していることを見出した。これら2つのクローンが有する遺伝子の配列によりコードされる推定アミノ酸から分子量を掲載  
10   したところ、それぞれ5 0, 8 9 4 D a及び約7 1, 9 0 0 D aであった。本発明者らは、これらのクローンをそれぞれp 5 1 A及びp 5 1 Bと命名した。

上記で得られたp 5 1 Aクローンが有する遺伝子(p 5 1 A遺伝子)の全塩基配列を配列番号2に、またp 5  
15   1 Bクローンが有する遺伝子(p 5 1 B遺伝子)の全塩基配列を配列番号5に示す。

p 5 1 Aクローンは、配列番号2に示すように、配列番号1で示されるアミノ酸配列(4 4 8アミノ酸)をコードする塩基配列(1 3 4 4ヌクレオチド)を、オープン・リーディング・フレームとして1 4 5～1 4 8 8位  
20   に有する遺伝子を有していた。また、このクローンが有する遺伝子の塩基配列によりコードされる推定アミノ酸

配列において、転写活性化領域は1～59位、DNA結合領域は142～321位、及びオリゴメリゼーション領域は359～397位であった。

一方、p51 B クローンは、配列番号5に示すように、  
5 配列番号4で示されるアミノ酸配列（641アミノ酸）  
をコードする塩基配列（1923ヌクレオチド）を、オープン・リーディング・フレームとして145～206  
7位に有する遺伝子を有していた。また、このクローン  
が有する遺伝子の塩基配列によりコードされる推定アミ  
10 ノ酸配列において、転写活性化領域は1～59位、DNA  
結合領域は142～321位、及びオリゴメリゼーション  
領域は353～397位であり、これは更に、C末端  
側の領域に付加的配列（SAMドメイン）を有してお  
り、当該付加的配列を含む353～641位の領域を広  
15 義のオリゴメリゼーション領域とみることができる。

本発明のp51 A 遺伝子でコードされるアミノ酸配列  
をp53蛋白及びp73  $\beta$  蛋白のアミノ酸配列と比較  
し、三者間の相同性を調べた（図2）。なお、図中、三者  
間で同一のアミノ酸を四角で囲んで示す。

20 また図1に、p51 A 蛋白の構造的なドメインの特徴  
を、p53蛋白及びp73  $\beta$  蛋白とともに、シェーマ的  
に示す。図中「TA」は転写活性化領域、「DNA bindin

g」はDNA結合領域、「oligo」はオリゴメリゼーション領域をそれぞれ示す。尚、p 5 1 蛋白とp 7 3  $\beta$  蛋白の構造的特徴はp 5 3 蛋白の構造的な特徴から推測した。

これらの結果、全配列、転写活性化領域、DNA結合  
5 領域及びオリゴメリゼーション領域における、それぞれのp 5 1 A 蛋白、p 5 3 蛋白及びp 7 3  $\beta$  蛋白の推定アミノ酸配列の相同性は、p 5 1 A 蛋白及びp 5 3 蛋白間では、それぞれ3 6 %、2 2 %、6 0 %、3 7 %；p 5  
1 A 蛋白及びp 7 3 蛋白間では、それぞれ4 2 %、3 0  
10 %、8 7 %、6 5 %；更にp 5 3 蛋白及びp 7 3 蛋白間では、それぞれ2 8 %、2 7 %、6 3 %、8 3 %であった（表1 参照）。

また、p 5 1 A 蛋白の4 4 8 アミノ酸残基は、p 7 3  $\alpha$  蛋白の6 3 6 アミノ酸残基より短いものの、p 5 1 A  
15 蛋白の全構造はp 7 3 のカルボキシ末端部位が割裂した部分が類似していた。

これらの結果から、p 5 1 A 蛋白の推定アミノ酸配列は、p 5 3 蛋白及びp 7 3  $\beta$  蛋白のいずれとも類似しているものの、p 5 3 蛋白のアミノ酸配列よりもp 7 3  $\beta$   
20 蛋白のアミノ酸配列に相同性が高く、またp 5 1 A 蛋白とp 7 3  $\beta$  蛋白との相同性は、オリゴメリゼーション領域以外の領域で、p 5 3 蛋白とp 7 3  $\beta$  蛋白の相同性よ

りも高いことが判明した。更に p 5 1 A 蛋白及び p 7 3  $\beta$  蛋白間では、p 5 3 蛋白及び p 7 3  $\beta$  蛋白間又は p 5 3 蛋白及び p 5 1 A 蛋白間で相同性がない領域においても、相同性が認められた。これらのことから p 5 1 A 蛋白は、アミノ酸配列レベルにおいて p 5 3 蛋白よりも p 7 3  $\beta$  蛋白により近似しているといえる。

また、同様に本発明の p 5 1 B 遺伝子でコードされるアミノ酸配列を p 7 3  $\alpha$  蛋白のアミノ酸配列と比較し二者間の相同性を調べた（図 3）。なお、図において二者間で同一のアミノ酸を四角で囲んで示す。

また、図 4 に p 5 1（A 及び B）遺伝子によってコードされるスプライシング変異体の構造的なドメインの特徴を、p 7 3 蛋白（ $\alpha$  及び  $\beta$ ）とともに、シェーマ的に示す。p 5 1 A 蛋白と p 5 1 B 蛋白の分岐点はイントロン 10 で始まっているのに対し、p 7 3  $\alpha$  蛋白と p 7 3  $\beta$  蛋白の分岐点はイントロン 13 で始まっていた。

## 実施例 2 正常ヒト組織における p 5 1 m R N A 発現の確認

### 20 （１）ノーザンブロット分析

正常ヒト組織における p 5 1 m R N A の発現を、ランダム・オリゴヌクレオチド・ブライミング法によって標

識したヒト c D N A クローンをプローブとするノーザン  
ブロット法により評価した。

ノーザンブロット分析は、製品使用法に従い、ヒト M  
T N ブロット (Human Multiple Tissue Northern blot  
5 ; クローンテック社製、パロ・アルト、カリフォルニア、  
米国) を用いて実施した。

即ち、実施例 1 で得られた D N A クローンの P C R 増  
幅産物の E c o R I 断片 ( 6 0 0 b p : c D N A の 5 '  
端に相当する) を [ <sup>32</sup>P ] - d C T P (ランダムプライ  
10 ムド D N A ラベリングキット、ベーリンガー・マンハイム  
社) により標識してプローブとした。

なお、ブロッティングは、ExpressHyb Hybridization  
Solution (クローンテック社製) を用いて、使用説明書  
に記載されている条件に従って行い、BAS2000 (FUJI) を  
15 用いて検出した。

結果を図 5 及び図 6 に示す。

なお、図 5 はクローンテック社よりフィルターを購入  
して行ったノーザンハイブリダイゼーション、図 6 はク  
ローンテック社より R N A を購入して自分でフィルター  
20 を作製して行ったノーザンハイブリダイゼーションの結  
果である。図 5 は各レーン 2  $\mu$  g のポリ A + R N A 、図  
6 は各レーン 0 . 5  $\mu$  g のポリ A + R N A を付して泳動

したものである。

図 5 の各レーンは、1 : 心臓、2 : 脳、3 : 胎盤、4 : 肺、5 : 肝臓、6 : 骨格筋、7 : 脾臓、8 : 膵臓についての結果をそれぞれ表わす。図 6 の各レーンは、1 : 5 乳腺(mammary gland)、2 : 前立腺(prostate)、3 : 唾液腺(salivary gland)、4 : 胃(stomach)、5 : 胸腺(thymus)、6 : 甲状腺(thyroid)、7 : 気管(trachea)、8 : 子宮(uterus)についての結果を示す。

その結果、ヒト p 5 1 遺伝子と命名された本発明の遺  
10 伝子の m R N A (4.4kb) の発現は、いたるところに発現する p 5 3 m R N A の発現パターンとは対照的に、むしろ限定的であり、骨格筋において最も高く発現しており、それに続いて胎盤、trachea、mammary gland、prostate、salivary gland、thymus、uterus、stomach、肺、脳、及  
15 び心臓の順で高く発現していることがわかった。その他の組織(例えば、adrenal gland, small intestine, spinal cord, spleen)では p 5 1 m R N A の発現は検出できなかった。

p 7 3 遺伝子の発現も組織限定的である。しかし、p  
20 5 1 遺伝子の発現は、p 7 3 遺伝子の発現と重複しているものの(同じ組織で発現が見られる)、p 7 3 遺伝子よりも広い範囲に発現していることがわかった。

このようにヒト p 5 1 遺伝子、p 5 3 遺伝子及び p 7 3 遺伝子は、組織の発現分布に相違があることから、これらの遺伝子は互いに類似した生物活性を有しているにも係わらず、生体内において組織に応じて異なる機能を有している可能性も示唆された。

また、更なる研究によって、種々のヒト組織における p 5 1 m R N A には、p 7 3 蛋白と同様に、p 5 1 A 蛋白をコードする短いフォームと p 5 1 B 蛋白をコードするより長いフォームの、選択的スプライスされた形態 (alternative splicing variant) が存在することがわかった。なお、後者の p 5 1 B をコードする長いフォームは、舌のグルタミン酸レセプターに対するサーチによって偶然見つかった k e t と名づけられものに相同性を有していた。骨格筋における主な転写物である 3 k b の m R N A が、調べた全組織に観察された最も多い m R N A であった。短いフォームの c D N A クローンは、この転写物に由来するものと思われる。興味深いことに、正常組織で観察される m R N A とは対照的に、腫瘍細胞系の多くではこの短いフォーム ( p 5 1 A ) の p 5 1 m R N A が発現していた。

p 5 1 蛋白と p 7 3 蛋白の各 alternative splicing variant の構造の比較をシューマ的に示す図を図 4 に示



す。この p 5 1 B の m R N A は、p 7 3  $\alpha$  と類似する分子量（計算）を持つ蛋白質をコードしていた。

p 5 1 A 及び p 5 1 B の両方間の機能的な違いについては不明である。

5

### 実施例 3 p 5 1 遺伝子の染色体マッピング

ラジェーションハイブリッドパネル（GeneBridge 4 Radiation Hybrid Panel; Research Genetics社）を用いて、p 5 1 遺伝子をヒト染色体上にマップした。その結果、p 5 1 遺伝子は、マーカー A F B M 3 2 7 Y D 9 と W I - 1 1 8 9 の間（前者マーカーから 5 . 6 6 c R ）、3 q 2 8 -ter に局在した。

### 実施例 4 種々のヒト癌細胞株とヒト腫瘍における p 5 1 変異

p 5 1 遺伝子について最も興味があるのは、p 5 3 腫瘍抑制遺伝子が有する特徴を該 p 5 1 遺伝子が有するかどうか、また該遺伝子の変異とヒト腫瘍の形態形成との関係である。

そこで、各種腫瘍細胞株を用いて、p 5 1 遺伝子の変異の有無を検索した。なお検索方法には、以前本発明者らが p 5 3 変異を決定する際に用いた、酵母の独立アレ

イ体の機能分析法 (FASAY) を採用した (Ishioka et al., Nat. Genet. 5, 124-129 (1993))。

ヒト p 5 1 A 遺伝子をコードする全配列に及ぶ相補的な D N A 断片を、先の測定に使用した P C R によって増幅して、p 5 1 A 遺伝子をコードする全配列をカバーする増幅断片の塩基配列を取得し、この塩基配列を直接配列決定法により決定し変異の有無を検出した。

腫瘍細胞は 5 % C O<sub>2</sub> 条件下で 1 0 % ウシ胎児血清添加ダルベッコの修飾必須培地 (Dulbecco's Modified Essential Media) 中で培養した。p 5 1 A c D N A の全ては、先の分析において p 5 3 c D N A を増幅することが可能であったので、これによって細胞株の c D N A の品質は保証された。

1 0 2 の細胞株の中から分析された 6 7 株が p 5 1 A D N A 断片の増幅が可能であった。そのうちの 3 5 株について、直接配列決定法によって塩基配列が決定された。

頭頸部の癌細胞株の H o - 1 - u - 1 ( J C R B 0 8 2 8 )、と頸部癌細胞株の S K G - I I I a ( J C R B 0 6 1 1 ) の二つの細胞株に変異が認められた。

2 0 前者は S e r<sup>145</sup> から L e u、後者は G l n<sup>165</sup> から L e u の変異であった。p 5 3 蛋白に関しては、前者は変異型、後者はヒトパピローマウイルス感染によって、p

5 3 蛋白の正常機能が失われていることが推測される。  
また、腫瘍細胞に由来する mRNA には種々の splicing  
variant が存在していた。

ヒト原発腫瘍に関して、SSCP 法及び RT-PCR  
5 法により得られる DNA 増幅産物の塩基配列を直接塩基  
配列決定法によって決定し、p51A 遺伝子変異を検索  
した。neuroblastoma 8 例、colon cancer 8 例、breast  
cancer 8 例、lung cancer 8 例、brain tumor 8 例、esop  
hageal cancer 8 例、hepatocellular cancer 8 例、panc  
10 reas cancer 6 例、renal cancer 4 例の計 66 例のヒト腫  
瘍のうち、肺ガン 1 例において Ala148 から Pro への  
変異を検出した。

これら 3 例の解析はいずれも cDNA の解析であり、  
単一の染色対座から発現していることは明らかであっ  
15 た。

#### 実験例 1 p51 形質転換によるコロニー形成の抑制

p53 蛋白は G1 期における細胞をブロックする、或  
いはアポトーシスを誘導する能力を持っている。

20 本発明の p51 蛋白について、コロニー形成抑制能力  
を調べるために SAOS2 骨肉腫細胞株（寄託番号：A  
TCC HTB85）中にプロマイシン抵抗性の発現プ

ラスミド (pBABEpuro :Morgenstern J.Nuc.Acids Ru, 1  
8,3587,1990) と共に p 5 1 A 発現コンストラクト、p 5  
1 A に H A 標識した発現コンストラクト (H A 標識 - AT  
GTATCCATATGATGTTCCAGATTATGCT : アミノ酸配列 MYPYDVPD  
5 YA をコードする)、P 5 3 発現コンストラクト及びベクタ  
ーをコ・トランスフェクトしコロニー形成能を調べた。

なお各発現ベクターは、p 5 1 A D N A のコード領域  
断片 ( 2 8 1 6 塩基、配列番号 2 において塩基番号 1 ~  
2 8 1 6 番め)、前記 p 5 1 A c D N A に H A タグを付  
10 けた断片、及び p 5 3 c D N A のコード領域断片 ( 1 6  
9 8 塩基、塩基番号 6 2 ~ 1 7 6 0 番目) をクローニン  
グすることによってそれぞれ構築した。次いで、骨肉腫  
細胞株である S A O S 2 細胞を 5 % C O <sub>2</sub> 条件下で 1 0 %  
ウシ胎児血清添加ダルベッコの修飾必須培地中で培養し  
15 た。6 c m シャーレ ( 1 × 1 0 <sup>6</sup> 細胞 / シャーレ ) に上記  
S A O S 2 細胞を播いて、2 4 時間後に p 5 1 A c D N  
A 鎖を含む野生型 p 5 1 発現ベクター ( p R c C M V /  
p 5 1 A ) で形質転換させた。同様に p 5 1 A c D N A  
に H A タグを付けた H A p 5 1 A 、及び野生型 p 5 3 遺  
20 伝子並びに、コントロールとして p R c C M V 発現ベク  
ターのみを形質転換させた。

1 μ g の pBABEpuro を Mammalian transfection Kit (S

trategene社)を用いて細胞に導入した。得られた細胞を固定し、クリスタル・バイオレッドで染色した。染色した細胞のコロニーを写真撮影した。各形質転換は各々2回実施し、このようにしてコロニー形成を分析した。

- 5       その結果、コロニー数の有意な減少が p 5 3 遺伝子並びに p 5 1 遺伝子で形質転換した細胞を培養した皿内で観察され、それとは対称的にベクターのみでトランスフェクトした細胞を培養した皿には数多くのコロニーが育っていた。このように p 5 1 遺伝子にはコロニー形成を  
10 抑制する能力が認められたが、p 5 3 遺伝子の能力よりもやや劣っていた。その一方で、H A タグの付いた p 5 1 遺伝子は、p 5 3 遺伝子と同等のコロニー抑制能力を持っていた (図 7)。

## 15   実験例 2   p 5 1 蛋白の転写活性化機能試験

G 1 期における細胞の阻止又はアポトーシスの誘導に対する p 5 3 蛋白の能力は p 5 3 蛋白の転写活性化機能に依存していることから、p 5 1 蛋白について、それがその活性を発揮するかどうか試験した。

- 20       p 5 3 転写活性化機能によって調節されることが知られている W a f 1 プロモーターと R G C (ribosomal gene cluster) 配列の下流にルシラーゼ・リポーター・プラ

スミドと共に p 5 1 A 遺伝子の発現構築物を実施例 5 の方法に準じて導入した。具体的には、S A O S 2 細胞を、上記ルシフェラーゼ・リポーター・プラスミドと、p 5 1 A 発現ベクター、p 5 3 発現ベクター又はコントロール・ベクターのいずれかと一緒にコ・トランスフェクトし、得られた形質転換体から調製した l y s a t e についてルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性はデュアルルシフェラーゼ・リポーター測定システム(プロメガ社製)を用いて形質転換効率を考慮して算出した。

10 図 8 に、実験に用いたリポーター構築物をシェーマ的に示す。該図中に、種々の p 2 1 W A F 1 プロモーター下流に調節された 3 つの蛍光ルシフェラーゼ遺伝子構築物が示される。図中、「WAF-1 promoter luc」は、二つの p 5 3 調節エレメントを残している野生型 p 2 1 W A F 1 プロモーター構築物、「del 1」は一つの上流エレメントが取り除かれている構築物、及び「del 2」は両エレメントが取り除かれている構築物をそれぞれ示す。

結果を図 9 及び図 1 0 にそれぞれ示す。縦軸の Relative activity は、デュアルルシフェラーゼ・リポーター測定システムを用いて形質転換効率を考慮して換算されたルシフェラーゼ活性である。

図 9 は、図 8 に示した種々のリポーター構築物を有す

る各 p 5 1 発現プラスミド (p51A)、p 5 3 発現プラスミド (p53) またはベクターのみ (Rc/CMV) のそれぞれを S A O S 2 細胞に導入した際の transactivation 活性を示す。その結果から、p 5 1 蛋白には、p 5 3 蛋白と同様に p 5 3 反応性配列の数依存的な発現を誘導する活性を有することが示された。

図 1 0 は、p 5 3 反応性が実験的に示されている P G C リポーター構築物を用いて、該リポーター構築物を有する各 p 5 1 A 発現プラスミド (p51A)、p 5 1 A に H A 標識した発現プラスミド (HAp51A)、p 5 3 発現プラスミド (p53) またはベクター (RcCMV) を用いて同様な実験を行った結果を示す。その結果から、図 9 に示した実験結果と同様に、p 5 1 A 及び HAp51A はいずれも p 5 3 と同じように p 5 3 反応性配列の数依存的な発現を誘導する活性を有することが示された。p 5 1 A 発現プラスミドを用いた場合に活性が弱いのは、leader sequence を付加したまま発現ベクターに組み込んだため、発現量が少ないものと推定される。

その後の実験で leader sequence を欠失させたところ、p 5 1 A 蛋白は、p 5 3 蛋白よりも強い発現誘導能を有し、前出のコロニー形成抑制能の点でも強い活性を有することが判明した。

上記の結果から、p 5 1 蛋白は、その転写調節領域を通して転写を誘導する能力を保有していた。該エレメントにおける変異誘導によって転写活性が消失することから p 5 1 蛋白も p 5 3 蛋白と同一の認識配列を利用して  
5 いる可能性が示唆された。

次にこの転写関係が、in vivoについても言えるかどうかを確認した。H A 付加エピトープを持つ p 5 1 A 遺伝子の発現構築物を S A O S 2 細胞に短期に導入した。細胞が p 5 1 A 遺伝子を取り込むことから、p 5 1 A が核  
10 内に局在することが明らかとなり、それら細胞全てが p 2 1 W a f 1 のレベルを上昇させることが分かった。このことは、p 5 1 蛋白もまた、p 5 3 蛋白によってコントロールされることが知られている p 2 1 W a f 1 を誘導できることを示唆する。

15

### 実験例 3 初生腫瘍における p 5 1 遺伝子変異

p 5 1 遺伝子の変異を 6 6 名の患者の初生癌細胞（8 名の神経芽腫、8 名の大腸癌、8 名の乳癌、8 名の肺癌、8 名の脳腫瘍、8 名の食道癌、8 名の肝細胞癌、6 名の  
20 脾臓癌、及び 4 名の腎癌）を対象として、逆転写 - P C R - 一本鎖構造ポリモルフィズム（R T - P C R - S S C P）法及び D N A 配列決定法を用いて調べた。



# ( 1 ) R N A の 調 製

新鮮腫瘍サンプルを外科的に摘出後、直ちに凍結し、使用するまで - 8 0 °C で保存した。R N A はナカガワらの文献記載 (Nakagawa, A., et al., N. Engl. J. Med., 328, 847-854 (1993)) の方法で抽出した。

## ( 2 ) R T - P C R - S S C P 及 び D N A 配 列 決 定

全 R N A の 5  $\mu$  g を Superscript II 逆転写酵素 (ギブコ - B R L 社 製 ) と ランダム・プライマーを用いて c D N A に転写させた。c D N A の第 2 0 番目の一つの c D N A を P C R 増幅のために使用した。P C R - S S C P はマシヤマらの方法 (Mashiyama S. et al., Oncogene, 6, 1313-1318 (1991)) に従って実施した。より具体的には P C R 産物を p 5 1 A c D N A に対して 3 つのプライマーで増幅した。

15 P C R に使用したプライマーの塩基配列を以下に示す。

p51-F1 : 5' - AAAGAAAGTTATTACCGATG - 3'

p51-R1 : 5' - CGCGTGGTCTGTGTTATAGG - 3'

p51-F2 : 5' - CATGGACCAGCAGATTCAGA - 3'

20 p51-R2 : 5' - CATCACCTTGATCTGGATG - 3'

p51-F3 : 5' - CCACCTGGACGTATCCACT - 3'

p51-R3 : 5' - TGGCTCATAAGGTACCAG - 3'

p51-F4 : 5' - CATGAGCTGAGCCGTGAAT - 3'

p51-R4 : 5' - TATCTTCATCCGCCTTCCTG - 3'

p51-F5 : 5' - ATGAACCGCCGTCCAATT - 3'

p51-R5 : 5' - GTGCTGAGGAAGGTACTGCA - 3'

5 p51-F6 : 5' - TGAAGATCAAAGAGTCCCTG - 3'

p51-R6 : 5' - CTAGTGGCTTTGTGCCTTTG - 3'

ついで、ローディング緩衝液で 1 : 1 0 に 3 2 P d C  
T P をに希釈した。更に 9 8 °C で 5 分間変性させて、室  
10 温で 1 2 から 1 4 時間の間 2 0 0 ボルトにて 5 % グリセ  
ロールと 5 % ポリアクリルアミド・ゲル上にて分離した。  
電気泳動後、ゲルは、乾燥させて、移動したバンドが具  
体的に見えるようになるまで X 線フィルムに一晩露光さ  
せた。変異の存在又は不存在を確認するために、P C R  
15 産物を p G E M - T イーザー・ベクター(プロメガ社  
製)の中にサブ・クローニングし、続いて A B I 3 7 7 D  
N A シーケンサーを用いて配列決定を行った。

その結果、高度に分化した扁平上皮細胞癌の系統に属  
する肺癌の組織において、p 5 1 A 蛋白の推定 D N A 結  
20 合領域がアミノ酸置換した点変異(1 4 8 位の A l a が P  
r o に置換)が見つかった。その腫瘍は、前気管のリンパ  
節転移と胸膜の浸潤を示していた。無作為に選択した 5

つのクローンの全てが同じ変異を有していたことから、この腫瘍細胞が有する p 5 1 遺伝子は、単一对立性遺伝子であるか又は単一对立性遺伝子的に発現されたものである可能性が示唆された。

5

実験例 4 p 5 1 c D N A 導入によるアポトーシスの誘導作用

p 5 1 蛋白が、p 5 3 蛋白同様に、細胞のアポトーシスを誘導するかどうかについて検索した。

10 p 5 1 蛋白のアポトーシス誘導試験は、前述の本発明者らの方法、つまり細胞株を 3 2 °C で培養した時、アポトーシスの典型的な特徴を呈するトランジェニック・マウス赤白血病細胞株 (1 - 2 - 3 細胞株) を用いる方法に準じて行った (Kato, M. V., et al., Int. J. Oncol., 9, 269 (1  
15 996))。

なお、マウス赤白血病細胞株 (1 - 2 - 3 細胞株) は、Friend spleen focus forming virus gp55 遺伝子のトランスジェニックマウス由来の erythroleukemia から樹立され [Xu et al., Jpn. J. Cancer Res. 86:284-291 (1995);  
20 Kato et al., Int. J. Oncol. 9:269-277]、温度感受性 (t s) 変異 p 5 3 蛋白 (Ala1353Val: 点変異) のみを発現する細胞株である。当該 t s - 変異 p 5 3 蛋白は、通常の

培養温度である 37℃では細胞質内に局在し、p53分子が本来核内で果たすべき制御機能が発揮されないが、32℃では核内に移行してp53の活性が誘導される〔Levine, A.J. et al., Nature 351: 453-456 (1991)〕。この細胞株では、32℃で緩慢なアポトーシスが誘導されることが既に報告されている。

1-2-3細胞を、5% CO<sub>2</sub>条件下で10% 仔ウシ胎児血清添加RPMI 1640培地中にて培養した。次いで、該細胞にpRc / CMVを発現ベクターとして、p51A遺伝子を導入し、選択培地で培養してネオマイシン耐性 (Neo<sup>r</sup>) に基づいて、G418耐性細胞を選択し、p51A発現細胞でのアポトーシスについて検討した。

すなわち、p51A遺伝子を含む発現ベクター (pRc CMV / p51A) で形質転換した2つのp51A導入1-2-3細胞 (以下「1C1細胞」及び「4B1細胞」という)、及び対照としてベクターだけを導入し、p51A遺伝子を含まない1-2-3細胞 (以下、「1-2-3細胞」という) を、それぞれ  $1 \times 10^5 / \text{ml}$  の濃度で10cm径のプレートに植え、37℃と32℃の2つの条件下で、24時間培養後、細胞を回収した。該細胞をProteinaseK及びRNaseA処理によってDNAサンプル

ルとし、得られたDNAサンプルをアガロース電気泳動した。そのエチジウムブロマイド染色像を図11に示す。

図からわかるように、37℃での培養では、1-2-3細胞についてはDNA断片を検出することはできなかった（レーン1）が、p51A遺伝子が導入された1C1細胞及び4B1細胞については、180bpオリゴマーへのDNA断片化が検出できた（レーン2及び3）。

32℃での培養では、1-2-3細胞のDNA断片化が検出されるとともに（レーン4）、1C1細胞及び4B1細胞でのDNA断片化が促進された（レーン5及び6）。この結果は、以下の述べるアポトーシスの形態観察の結果及びp51導入細胞の増殖抑制（32℃、37℃）の結果と一致するものであった。

細胞のアポプティックな形態的変化の有無は、各細胞をガラス・スライドに固定し、ギムザ染色にて染色して、細胞形態及び染色の程度を顕微鏡で観察することにより行った。なお、細胞の生存数は、トリパンブルー染色にて染色し、細胞の生存数カウントして求めた。

その結果、32℃で培養した細胞は、細胞表面上の突起物を持ち、縮み、歪曲又はくびれた形態を呈していた。またギムザ染色細胞標本において、核膜の周囲又は細胞内の集塊内のいずれかにクロマチン凝縮が観察された。

一方、37℃で培養した細胞については、このような形態変化は観察されなかった。

また、32℃での培養24時間内ではアポトーシスにより死滅する細胞と、セルサイクルを継続して増殖する細胞が混在し、p51発現細胞の24時間後の細胞数は $1.0 \times 10^5 / \text{ml}$ で、1-2-3細胞の細胞数は $1.7 \times 10^5 / \text{ml}$ であった。

以上のことから、温度32℃で処理したp51遺伝子含有細胞は、p53と共同して急激なアポトーシスを起こしたことが確認された。このことからp51蛋白は、p53蛋白同様、有意にアポトーシスを誘導することが確認された。

#### 実験例 5

15 ヒトp51 B蛋白のC末端領域（アミノ酸配列の570～641位の領域）の特異抗体を作成し、ヒト細胞の免疫染色を行った。

すなわち、ヒトp51 B DNAの当該コード領域（塩基配列1851～206位の領域）をGST融合蛋白発現ベクターpGEX-1 $\lambda$ T（ファルマシア社）に連結し、大腸菌にて融合蛋白を合成した。この融合蛋白を用いて、常法に従い、BALB/Cマウスを用いて抗血清

(ポリクローナル抗体)を調製し、GST蛋白で吸収して、p51B蛋白のC末端領域の特異抗体を取得した。

上記抗体をヒト皮膚組織凍結切片と第1次反応させ、次いで蛍光標識ヤギ抗マウスIgG抗体と第2次反応させた。

その結果、当該抗体は、ヒト皮膚の棘細胞層から基底層にかけての細胞の核を特異的に染色した。この特異性は、上記融合蛋白による処理がこの反応を消去し、GST蛋白による前処理ではこの反応を消去し得なかったことで確認された。

### 産業上の利用可能性

本発明の遺伝子は、腫瘍抑制遺伝子として知られているp53遺伝子の関連遺伝子と位置づけられる。これらの遺伝子によれば、各細胞での発現レベルや機能を解析でき、またその発現物の解析等によって、これらが関与する疾患（例えば悪性腫瘍等）の病態解明や診断、治療等が可能になるものと考えられる。

また、本発明遺伝子は神経系で発現されるp73と対比して、腺組織（前立腺、乳腺）、筋組織、並びに胸腺などの免疫系に発現し、これらにおける異常に関与する可能性があり、これらの制御物質の開発に貢献するものと

考えられる。

本発明によれば、細胞増殖抑制遺伝子として有用な新規ヒト P 5 1 遺伝子が提供される。本発明の新規遺伝子は、p 5 3 蛋白又は p 7 3 蛋白をコードする遺伝子と類似性を有する。このため、解析されたこれらの関連遺伝子の機能と各種疾患との係わりについての研究に利用できる、各種疾患への遺伝子診断並びに該遺伝子の医薬用途への応用研究に用いることが可能である。また、本発明の遺伝子を利用することにより、各種ヒト組織での該遺伝子の発現状況が調べられ、ヒト生体内におけるその機能を解析することが可能となる。

また、該遺伝子によれば、該遺伝子がコードするヒト P 5 1 蛋白を遺伝子工学的に大量に製造することができる。すなわち本発明の遺伝子の提供によれば、その遺伝子及び遺伝子断片を発現ベクターに組み込み、リコンビナントヒト P 5 1 蛋白を作製し、p 5 1 蛋白活性や p 5 1 蛋白の結合活性等の機能を調べることができる。

また p 5 1 蛋白は、P 5 1 遺伝子及びその産物が関与する疾患（例えば、細胞の転写活性に関連する疾患や、アポトーシスに関連する各種疾患等、特に癌）の病態解明や診断、治療等に有用である。

p 5 1 蛋白は、p 5 3 と同様な生理学的作用又は機能



を有し、例えばウイルス感染、サイトカイン刺激、低酸素状態、ヌクレオチドプールの変化、薬物による代謝異常等といった各種生体ストレスが生体組織に及ぶと、他の蛋白質との相互作用によるシグナル伝達や他の遺伝子の転写制御などの機能を生ぜしめ、生体ストレスを受けた生体組織の細胞のDNAの複製を調節したり、細胞周期を停止させて細胞を修復するか、アポトーシスにより細胞を排除するか、或いは細胞の分化を促進したりすることで生体組織をストレスから防御することに寄与している」と予想される。

本発明によれば、ヒト p 5 1 遺伝子又はそのアレル体を含む遺伝子治療に有用な遺伝子導入用ベクター、該 p 5 1 遺伝子又はそのアレル体が導入された細胞及び該ベクター又は細胞を有効成分とする遺伝子治療剤、並びにその利用による遺伝子治療法等が提供される。

また本発明によれば、各種癌細胞の成長抑制作用を有し、該作用による各種癌の疾患及び病態の処置等に使用される p 5 1 蛋白を有効成分とする医薬も提供することができる。

なお、ヒトの p 5 1 遺伝子とマウスの当該遺伝子の機能的領域は、T A 領域の 3 個のアミノ酸以外の全て同一で、高度の保存性を示しており、その重要性が示唆され

る（両者の塩基配列の対比を図 1 2 ～ 1 4 並びに図 1 5 に示す。）。

10

15

20

## 請求の範囲

1. 以下の (a) 又は (b) の蛋白質をコードする遺伝子：

- 5        (a) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有する蛋白質  
      (b) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を有し、且つ p 5 1 活性を有する蛋白質。

10

2. 以下の (a) 又は (b) の DNA を有する遺伝子：

- (a) 配列番号 2 に示される塩基配列において、塩基番号 145～1488 に示される塩基配列からなる DNA  
15        (b) 配列番号 2 に示される塩基配列において、塩基番号 145～1488 に示される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ p 5 1 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

20

3. 配列番号 2 に示される塩基配列を有する請求項 2 記載の遺伝子。

4. 以下の (a) 又は (b) の DNA を有する cDNA  
:

(a) 配列番号 2 に示される塩基配列において、塩基  
5 番号 145～1488 に示される塩基配列からなる DNA  
A

(b) 配列番号 2 に示される塩基配列において、塩基  
番号 145～1488 に示される塩基配列からなる DNA  
A とストリンジェントな条件下でハイブリダイ  
10 ズし、且つ p51 活性を有する蛋白質をコード  
する DNA。

5. 配列番号 2 に示される塩基配列とストリンジェント  
な条件下でハイブリダイズすることを特徴とする DNA  
15 A。

6. 配列番号 2 の塩基番号 145～1488 に示される塩基配列  
とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするこ  
とを特徴とする DNA。

20

7. プライマーとして用いられる請求項 5 記載の DNA。

8. プローブとして用いられる請求項 5 記載の DNA。

9. 以下の (a) 又は (b) に示す蛋白質：

(a) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列を有する蛋白質

5 (b) 配列番号 1 に示すアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を有し、且つ p 5 1 活性を有する蛋白質。

10 10. 配列番号 1 において、少なくともアミノ酸番号 1 ～59、アミノ酸番号 142～321 及びアミノ酸番号 359 ～397 で示されるアミノ酸配列を有する請求項 9 記載の蛋白質。

15 11. 配列番号 1 において、転写活性化機能、DNA 結合性及びオリゴメリゼーション機能よりなる群から選択される少なくとも 1 種の機能を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド。

20 12. 以下の (a) 又は (b) に示すポリペプチド：

(a) 配列番号 1 においてアミノ酸番号 1 ～59 で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド

(b)(a)に示すアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を有し、且つ転写活性化機能を有するポリペプチド。

5

13. 以下の(a)又は(b)に示すポリペプチド：

(a) 配列番号1においてアミノ酸番号142～321で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド

10 (b)(a)に示すアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を有し、且つDNA結合性を有するポリペプチド。

14. 以下の(a)又は(b)に示すポリペプチド：

15 (a) 配列番号1においてアミノ酸番号359～397で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド

20 (b)(a)に示すアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列を有し、且つオリゴメリゼーション機能を有するポリペプチド。

15. 請求項12乃至13のいずれかに記載のポリペプ

チドをコードする塩基配列を有する遺伝子。

16. 請求項1の遺伝子を含むベクター。

5 17. 請求項16記載のベクターで形質転換された宿主細胞。

18. 請求項17記載の宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物から蛋白質を回収することを特徴とする、請求項10記載の蛋白質の製造方法。

10

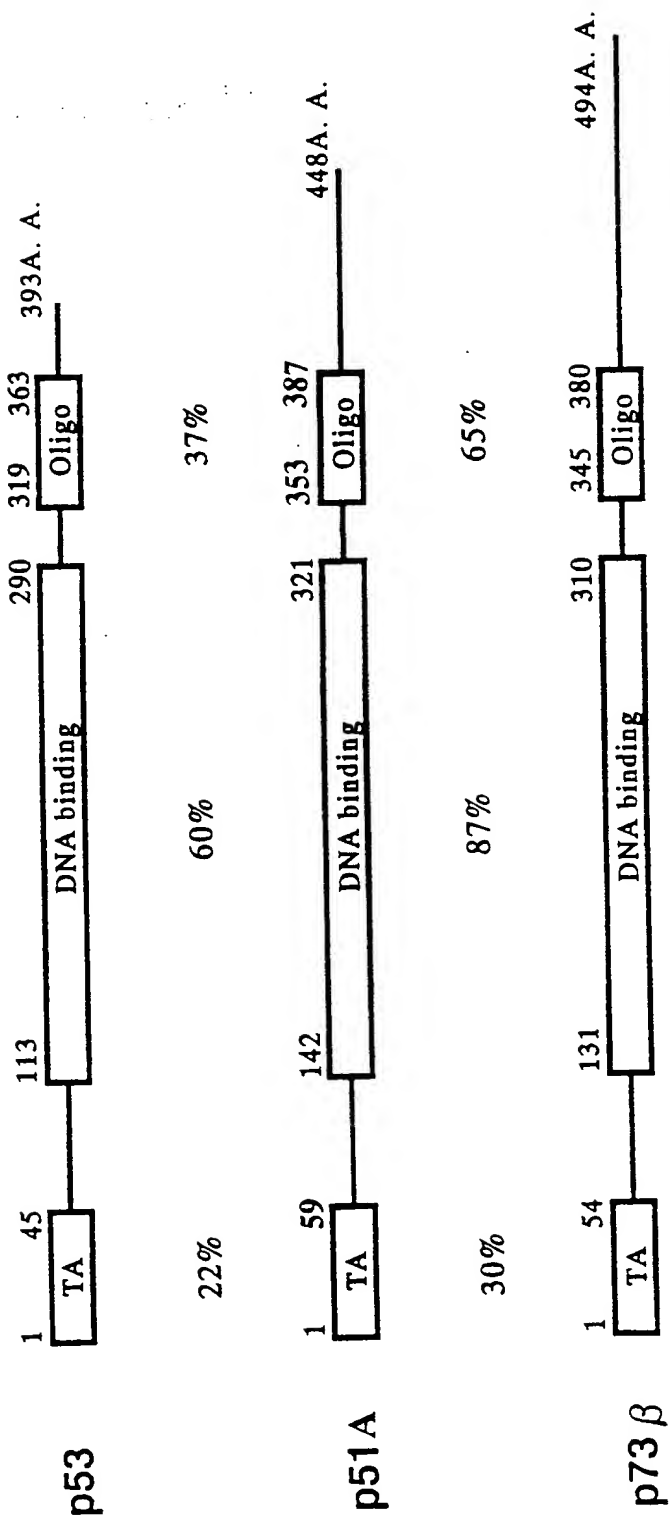
15

20

**This Page Blank (uspto)**



FIG. 1



*This Page Blank (uspto)*

2 / 15

## FIG. 2

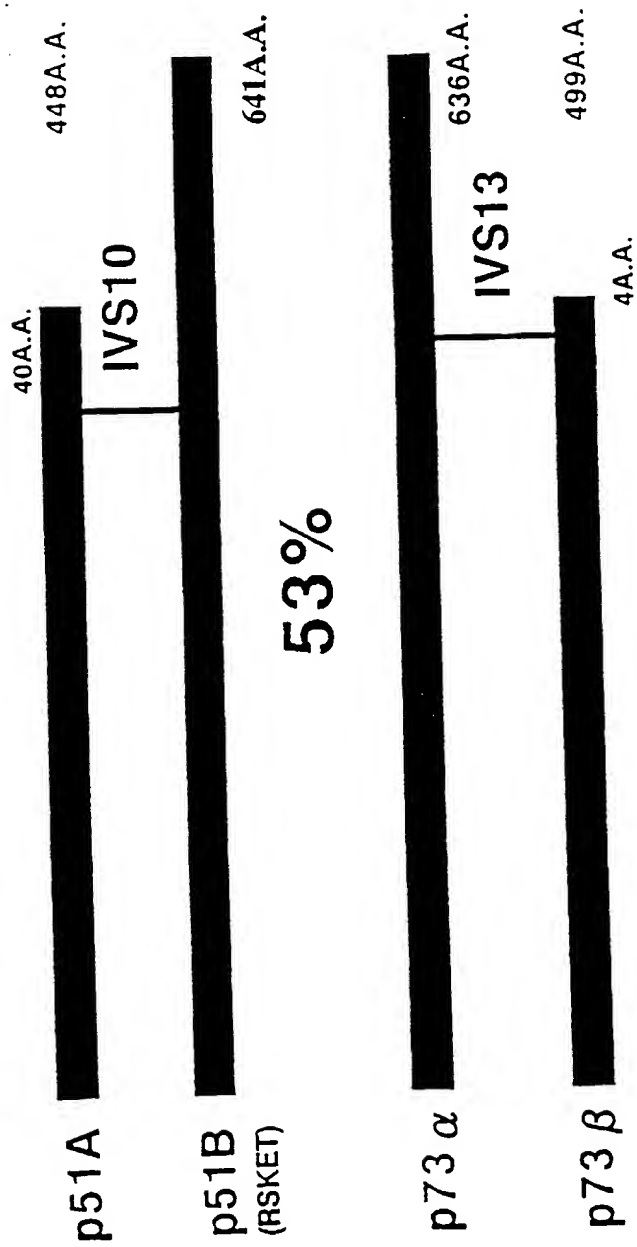
p51A	MSQSTQTNEF	LSPEVFQHIW	DFLEQPTCSV	QPIQLNFVDE	PSDEGATNKI	50
p73B	MAQSTATSP-	DGGTTFEHLW	SSUE-POSTY	--FQUP-QSS	RGHNEVVGGT	45
p53	MEEPQSDPS-	VEPPLSQETF	SOU-----	--WML-----L	PENNVLSPLP	36
Consensus	M.QST.T...	...P...FQH.W	S.U.E-P....	--.LL.....	P.NN.....	50
p51A	EISMQCIRMQ	DSOLSDPMWP	QYTNLGLLNS	MDQQIQNGSS	STSRMYTDHA	100
p73B	OSIMQVFHLE	--GHTTSVMA	QF---NLLSS	TMDQSSRAA	SASRYTPEHA	90
p53	SOAMQDLMLS	----PDDI-E	QW----FTED	PGPDEAPRMP	EAAH-RVARA	76
Consensus	..SMQ...L	....D....	Q-----LL.S	...Q...R..	SASEY...HA	100
p51A	QNSVTAPSPY	AQSSSTFDAL	SPSPAIPSNIT	DYFOPHSFQV	SFQSSSTAKS	150
p73B	-ASVPTHSPY	AQSSSTFDTH	SPAPVIPSNIT	DYFOPHREV	TFQSSSTAKS	139
p53	-PAAPTPAA-	PAPAPSW-PL	SSS--VPSOK	TYOCSYCFRL	QFLHSCTAKS	121
Consensus	-.SVPTPSPY	AQSSSTFD.L	SPSP.IPSNIT	DYFOPH.E.V	LFQSSSTAKS	150
p51A	ATHTYSTELK	KLYCQIAKTC	FIQIIVNTRP	PDCAVIRAMP	VYKKAENHTE	200
p73B	ATHTYSPULK	KLYCQIAKTC	FIQIIVSTRP	PDQTAIRAMP	VYKKAENHTE	189
p53	VTCTYSPALN	KMFQIAKTC	FIQLIVDSTP	PDQTRVRAMA	VYKQSQHATE	171
Consensus	ATHTYSPULK	KLYCQIAKTC	FIQIIV.TRP	PDQT.IRAMP	VYKKAENHTE	200
p51A	VNRCPNHHL	SREFNEQIA	PSHLIRVEG	NSHAQYVEDP	ITQRQSWAVR	250
p73B	VNRCPNHHL	GRDFNEQISA	PASHLIRVEG	NHLSQYVDDP	VTQRQSWAVR	239
p53	VNRCPNHER	CSD-SQ-IA	PSHLIRVEG	NLRVEYLQOR	NTRRQSWAVR	219
Consensus	VNRCPNHHL	.RDFNEQIA	PSHLIRVEG	N...QYVDDP	ITQRQSWAVR	250
p51A	YEPPVQTEF	TTILYNNMCN	SSQGMNRR	PILITITLET	RDQQLGRR	300
p73B	YEPPVQTEF	TTILYNNMCN	SSQGMNRR	PILITITLEM	RDQQLGRRS	289
p53	YEPPVQSDC	TTILYNNMCN	SSQGMNRR	PILITITLED	SSQNLGRRS	269
Consensus	YEPPVQTEF	TTILYNNMCN	SSQGMNRR	PTITITLET	RDQQLGRRS	300
p51A	FEARIACAPG	RDRKAQEDSI	RKQVSD--S	TKNGDGTKRP	FRQNTHTGI-Q	347
p73B	FEARIACAPG	RDRKAQEDHY	REQQALNESS	AKNGAASKRA	FKQSPPAVPA	339
p53	FENRVACAPG	RDRRTBEENL	RKKGEPH--H	ELPPGSTKRA	LPNNTSS---	314
Consensus	FEARIACAPG	RDRKAQED..	RKQV....S	.KNG..TKRA	F.QNT....	350
p51A	M-TSINKRRS	PDDELLYLPV	RGRBTYEMLL	KIMESLELMQ	YLPQHTIETY	396
p73B	LGAGVKKRRH	QEDTYLLQV	RGRBNREILM	KLMSLELME	LVPQPLVDSY	389
p53	--SPOPKCKP	LDGEYFTLQI	RGRBRREMR	ELNEALELKD	AQAGKEPPGS	362
Consensus	.....KRRR.	.D.E..YLQV	RGRB.REML.	KLMSLELM.	...PQ.....Y	400
p51A	RQQQQQHQ-	HL-----	---LQK-H-	-LLSACFRNE	LV-EPRRE--	427
p73B	RQQQQLLQRP	SHLQPPSYGP	VLSPMNVHVG	GMNKLPSVNO	LVGQPPPHSS	439
p53	RAHSS-----	HL-----	---K---	-----SKKGQ	---STSRH--	380
Consensus	RQQQQ....	HL-----	---LQ-H-	.....NQ	LV-.P.RH--	450
p51A	--TPKQSDV-	--FFR---HS	KPPN-----	-----RSVYP-	448	
p73B	AATPNLGPVG	PGMLNNHGHA	VPANGEMSSS	HSAQSMVSGS	HCTPPPPYHA	489
p53	---KKL----	--MFK---T	EGPD-----	-----SD---	393	
Consensus	--TPKL...V-	--MF---H-	.PPN-----	-----S.Y.-	500	
p51A	-----	-----	-----	-----	448	
p73B	DPSLVRTWGP	-----	-----	-----	499	
p53	-----	-----	-----	-----	393	
Consensus	-----	-----	-----	-----	510	

*This Page Blank (uspto)*

	MSQSTQNEF LSPVETQIHW DHLLQITCSV QPDLNFWDE PSEDGATNKI	50
p51B	MAQSTATSP - DGGTTHHLW SSLH ROSTY --HDLP-QSS RGNEVVGGT	45
p73d	MAQSTATSP - DGGTTHHLW SSLH ROSTY --HDLP-QSS RGNEVVGGT	45
Consensus	MAQSTATSP - DGGTTHHLW SSLH ROSTY --HDLP-QSS RGNEVVGGT	50
p51B	EISMDCTRMQ DSDLSQPMMP QYTHLQLHNS MDQDIQWSS STSPYNTQHA	100
p73d	DSSMDVFLHE --GNTTSVMA QF---HLSS TMQDQSSRAA SASPYTPBHA	90
Consensus	EISMDCTRMQ DSDLSQPMMP QYTHLQLHNS MDQDIQWSS STSPYNTQHA	100
p51B	QNSVTAARSPY AQPSTSTFAL SPSRAIPSNIT DYPGPHSEV FQOQSTAKS	150
p73d	-ASVPTHTSPY AQPSTSTFTM SFAFVTPSNIT DYPGPHSEV FQOQSTAKS	139
Consensus	QNSVTAARSPY AQPSTSTFAL SPSRAIPSNIT DYPGPHSEV FQOQSTAKS	150
p51B	ATWTYSTELK KLYCQIAKTC PIQIKVSTPP PQGAVIRAMP VYKKAHVTE	200
p73d	ATWTYSPULK KLYCQIAKTC PIQIKVSTPP PQGAVIRAMP VYKKAHVTD	189
Consensus	ATWTYSTELK KLYCQIAKTC PIQIKVSTPP PQGAVIRAMP VYKKAHVTE	200
p51B	VVKRCPMHEL SRFNEGQIA FASHLIRVEG NSHAQYVDP TGRQSVWVF	250
p73d	VVKRCPMHEL GPFNEGQIA FASHLIRVEG NNLQYVDP TGRQSVWVF	239
Consensus	VVKRCPMHEL SRFNEGQIA FASHLIRVEG NSHAQYVDP TGRQSVWVF	250
p51B	YEPPQVGTEF TILYNFMCH SSCVGMNRR PILIINTLET RDGQVLGRRC	300
p73d	YEPPQVGTEF TILYNFMCH SSCVGMNRR PILIINTLEM RDGQVLGRRC	289
Consensus	YEPPQVGTEF TILYNFMCH SSCVGMNRR PILIINTLET RDGQVLGRRC	300
p51B	FEARICACPG RDRKADEDSI RHOQVSD-S TKNDGTRKP FQONTHGI-Q	347
p73d	FEARICACPG RDRKADECHY RHOQALNESS AKNGAASKRA FQOSPPAVPA	339
Consensus	FEARICACPG RDRKADEDSI RHOQVSD-S TKNDGTRKP FQONTHGI-Q	350
p51B	M-TSKKKRRS RQDELTYLHV RGRETYEHL RIKESLELMQ YUPHTIETY	396
p73d	LGAGVKKRRH QGEDTYLQV RGRENREIL RIKESLELME LVPOPLVDST	389
Consensus	M-TSKKKRRS RQDELTYLHV RGRETYEHL RIKESLELMQ YUPHTIETY	400
p51B	RQOQQQQQH LLQKQTSIQS PPSYGNSSRP LNNH-NMKN LPSVQLINP	445
p73d	R-----QQQ LLQRPSTHC PPSYQVLPSP LNNHNGQANK LPSVQLVQG	433
Consensus	RQOQQQQQH LLQKQTSIQS PPSYGNSSRP LNNH-NMKN LPSVQLINP	450
p51B	QORNALTRIT IPOGQANIP MNGTHMFMAG DMNGUSPTQA LPPPLSHST	495
p73d	PPPHSSAATP NLGPVCPG-- MNNHGHAVP ANGHSSSH-- --SACSMSNG	478
Consensus	QORNALTRIT IPOGQANIP MNGTHMFMAG DMNGUSPTQA LPPPLSHST	500
p51B	SHCTPPPPYP TQSTYVFLA RLGGSSGLDY FTQGLTIY QIEMYSMDL	545
p73d	SHCTPPPPYM AQSUSVSFUT GLGPMQIEY FTQGLQSIY HLQMLTIEDL	528
Consensus	SHCTPPPPYP TQSTYVFLA RLGGSSGLDY FTQGLTIY QIEMYSMDL	550
p51B	ASLKIPEQRR MATWQILQH RQHEHSSPS HLLHTPSAS TVSGSSETR	595
p73d	GALKIPEQVR MWTWQLOOL KQGHQYTAQ QLLRSSMAYT ISIGGSLELQ	578
Consensus	ASLKIPEQRR MATWQILQH RQHEHSSPS HLLHTPSAS TVSGSSETR	600
p51B	GRVIGAVRF TURTQISFP R-----DE MDPHFMDA RRNKOCHKE	638
p73d	RQVYHVAHF RVHTTITFN RCGPGGGGDE MADKQFLPD CKARNCHKE	628
Consensus	GRVIGAVRF TURTQISFP R-----DE MDPHFMDA RRNKOCHKE	650
p51B	--EGB--	641
p73d	EFTBATH	636
Consensus	--EGB--	650

*This Page Blank (uspto)*

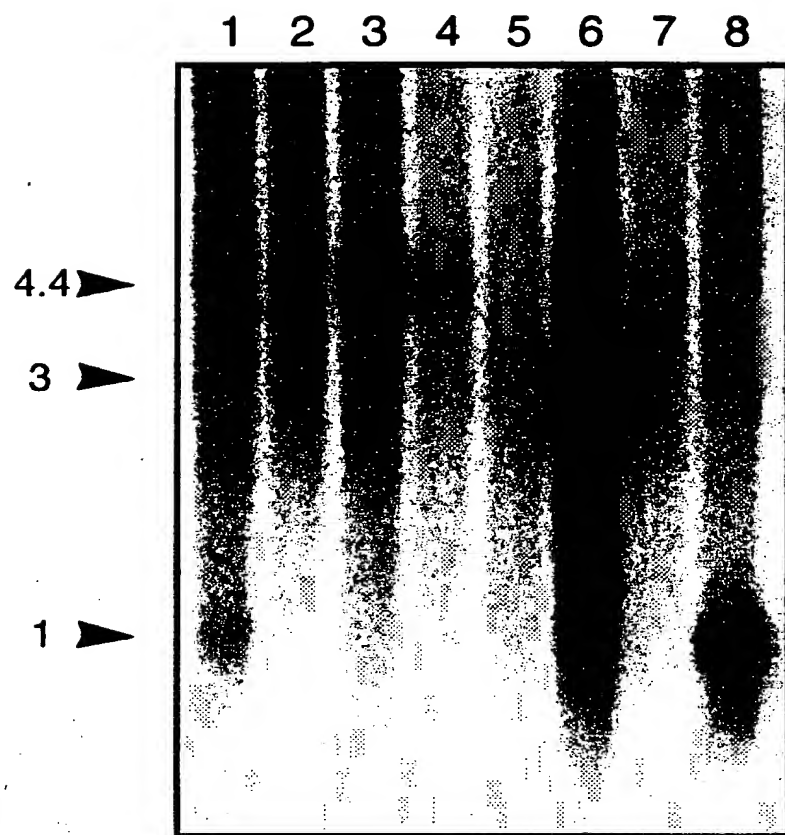
FIG. 4



This Page Blank (uspto)

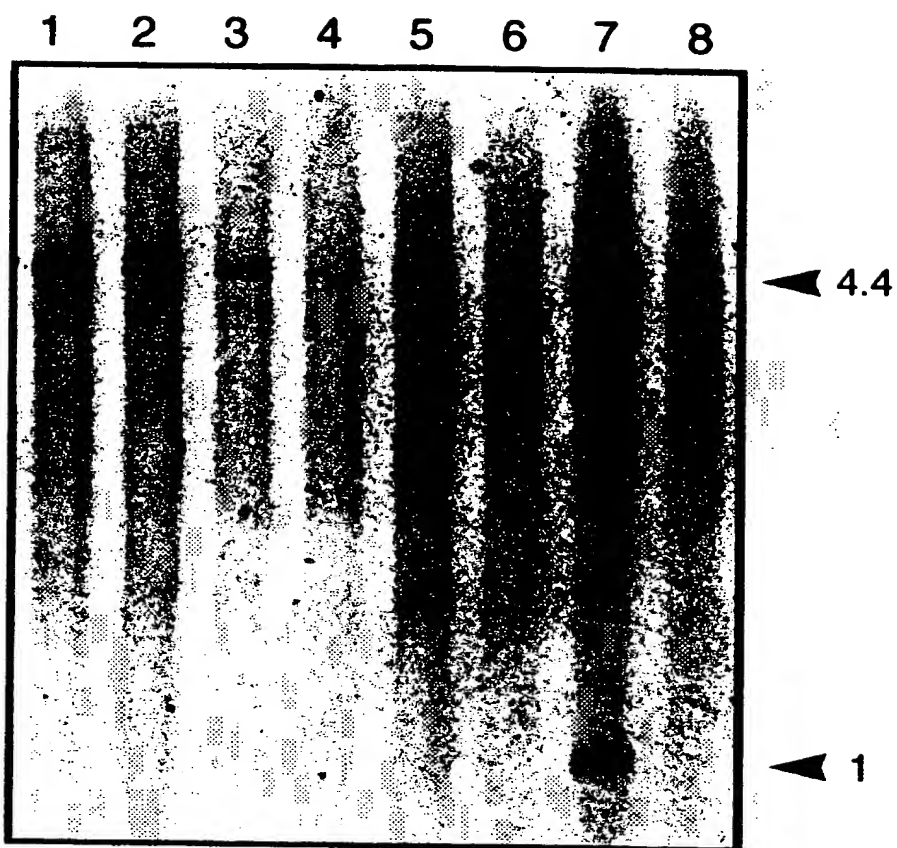


*F I G. 5*



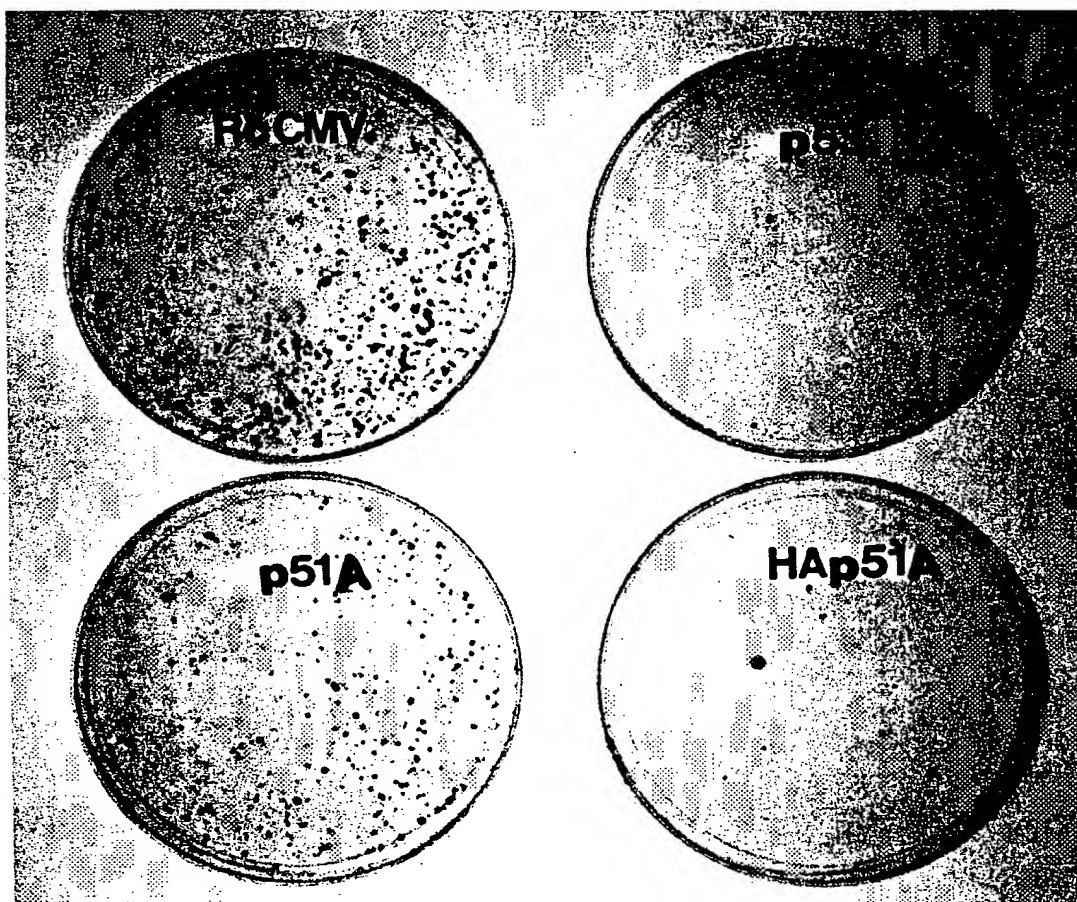
*This Page Blank (uspto)*

*F I G. 6*



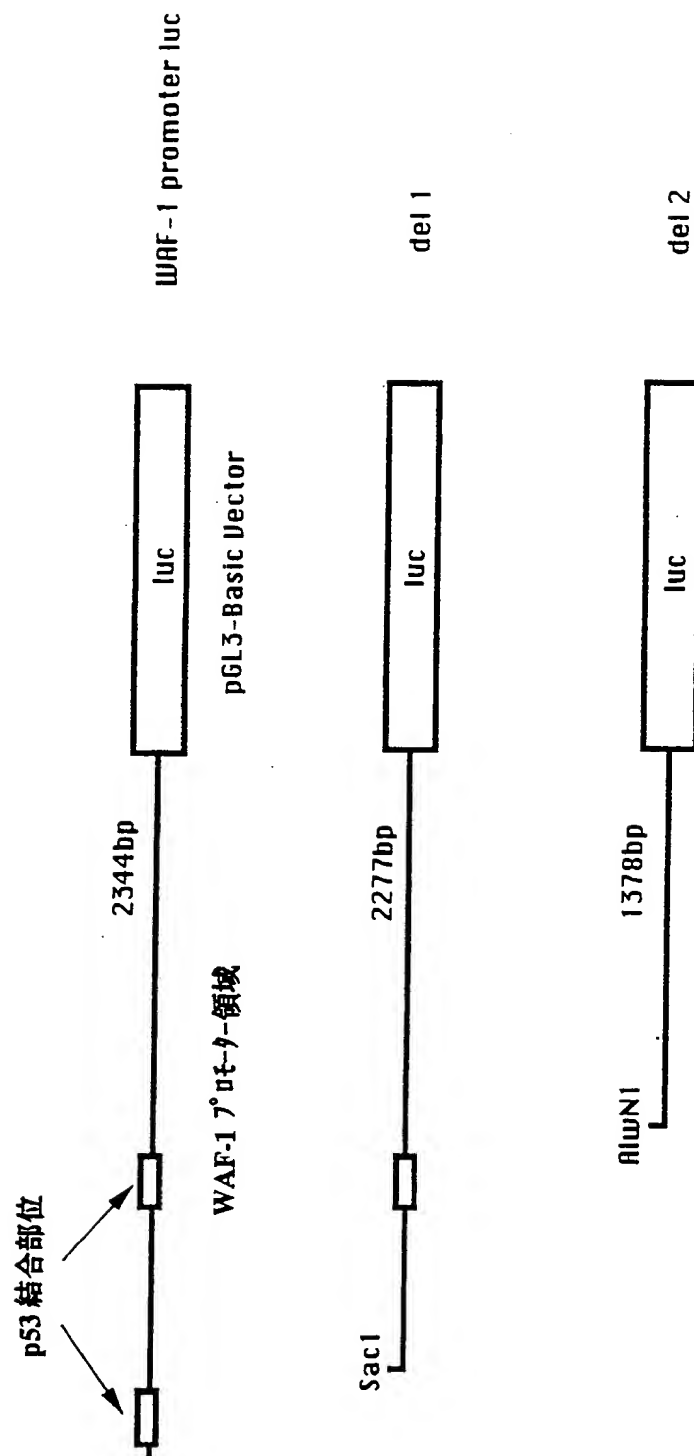
*This Page Blank (uspto)*

*FIG. 7*



*This Page Blank (uspto)*

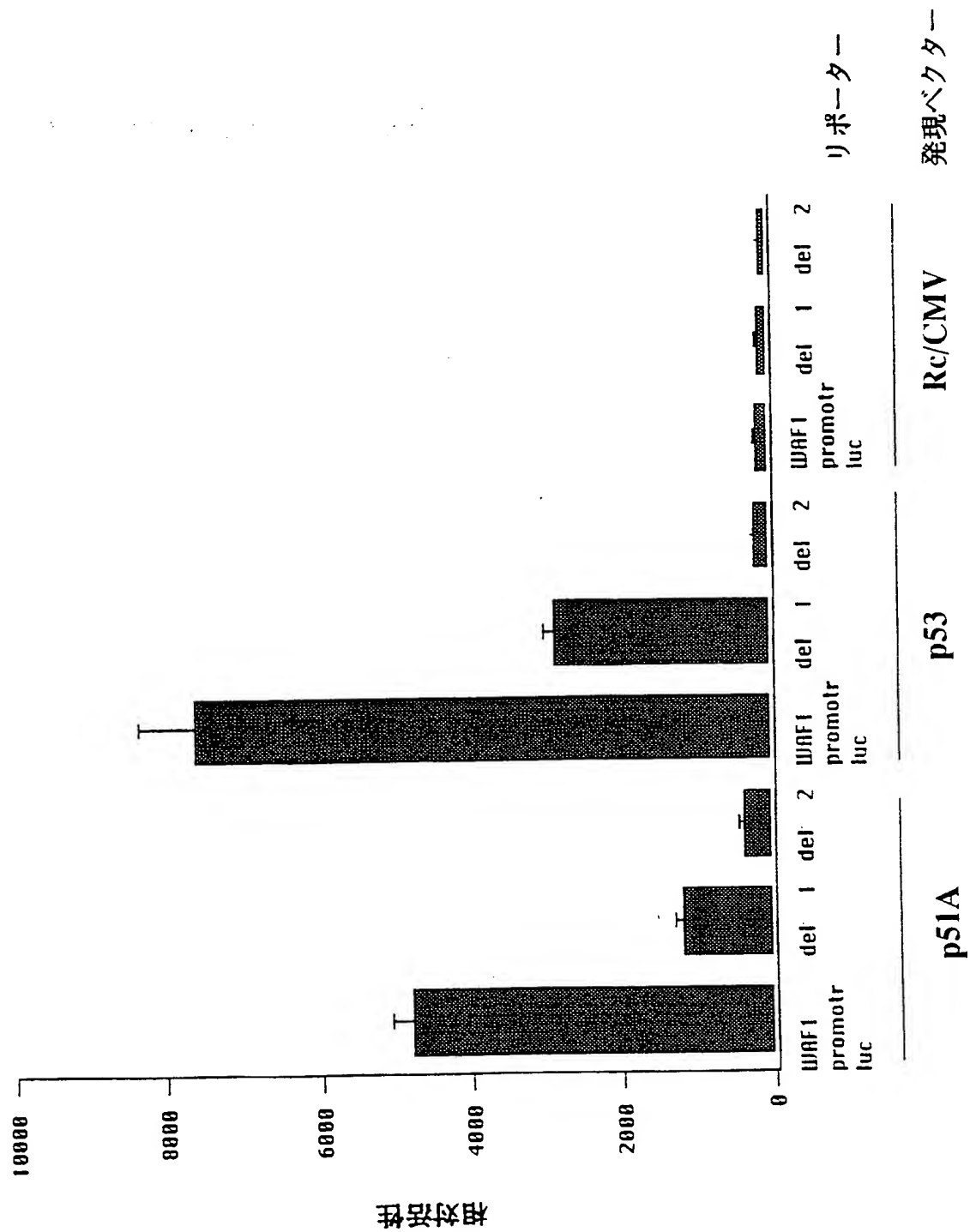
# F I G. 8



This Page Blank (uspto)

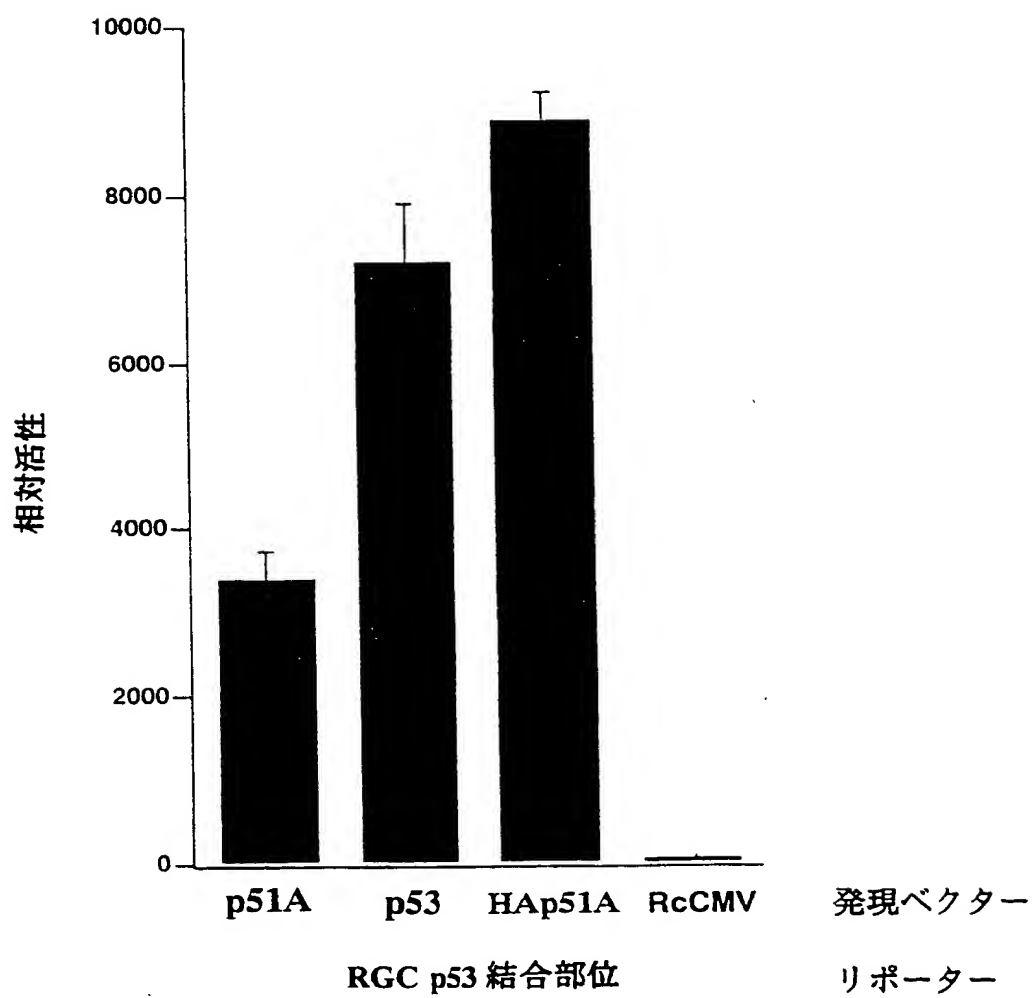


FIG. 9



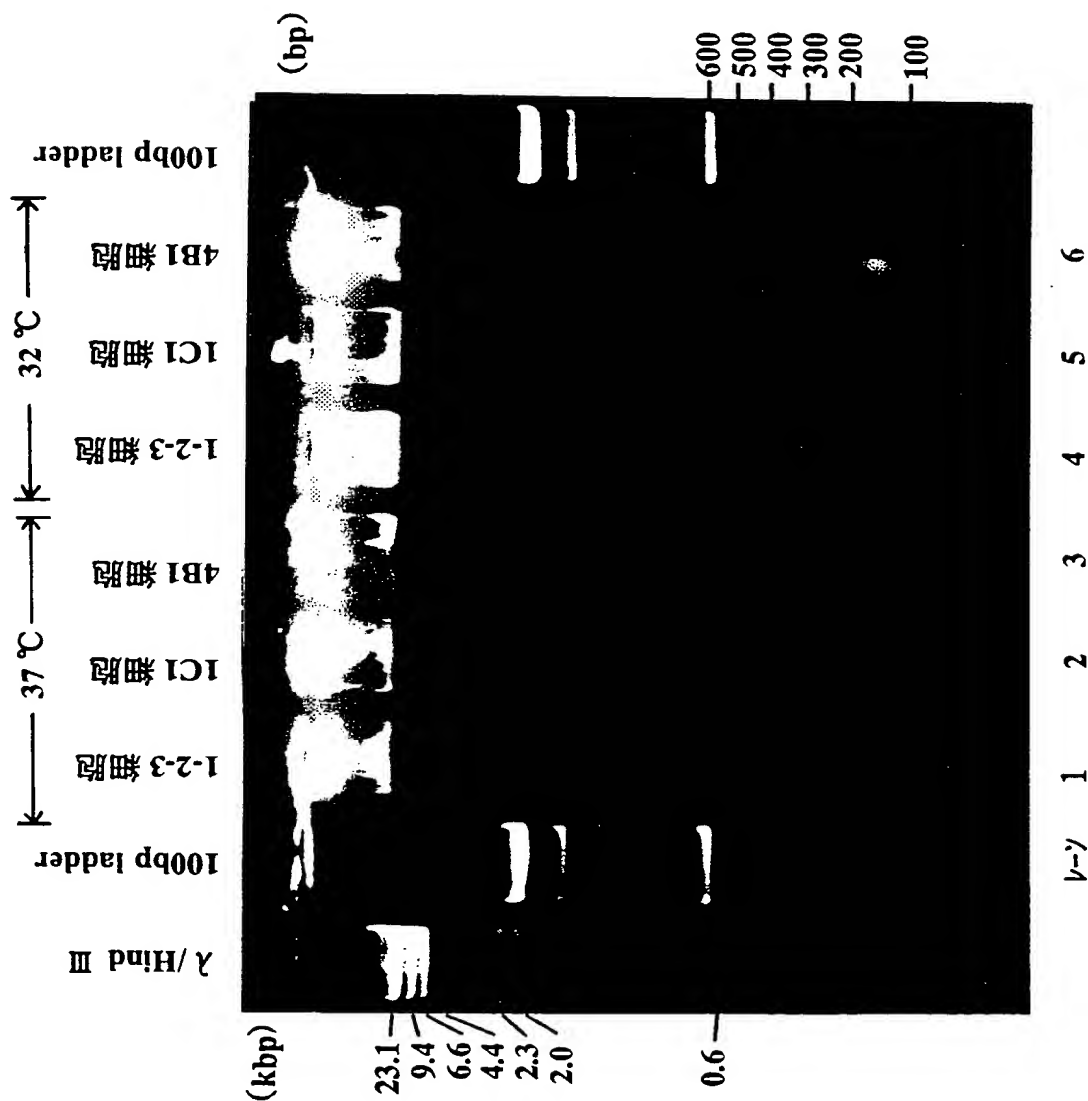
This Page Blank (uspto)

FIG. 10



This Page Blank (uspto)

FIG. 11



This Page Blank (uspto)

12 / 15

## F I G. 1 2

mp51	1	ATGTCGCAGAGCACCCAGACAAGCGAGTTCCTCAGCCCAGAGGTCTCCAGCATATCTGG	60
p51B	1	ATGTCCAGAGCACACAGACAAATGAATTCCTCAGTCCAGAGGTTTCCAGCATATCTGG	60
		*****	
mp51	61	GATTTTCTGGAACAGCCTATATGCTCAGTACAGCCCATCGAGTTGAACCTTGTGGATGAA	120
p51B	61	GATTTTCTGGAACAGCCTATATGTTCAAGTTCAGCCCATTGACTTGAACCTTGTGGATGAA	120
		*****	
mp51	121	CCTTCCGAAAATGGTGCAACAAACAAGATTGAGATTAGCATGGATTGTATCCGCATGCAA	180
p51B	121	CCATCAGAAGATGGTGCGACAAACAAGATTGAGATTAGCATGGACTGTATCCGCATGCG	180
		**.*	
mp51	181	GACTCAGACCTCAGTGACCCCATGTGGCCACAGTACACGAACCTGGGGCTCCTGAACAGC	240
p51B	181	GACTCGGACCTGAGTGACCCCATGTGGCCACAGTACACGAACCTGGGGCTCCTGAACAGC	240
		*****	
mp51	241	ATGGACCAGCAGATTCAGAACGGCTCCTCGTCCACCAGCCCCTACAACACAGACCACGCA	300
p51B	241	ATGGACCAGCAGATTCAGAACGGCTCCTCGTCCACCAGTCCCTATAACACAGACCACGCG	300
		*****	
mp51	301	CAGAATAGCGTGACGGCGCCCTCGCCCTATGCACAGCCCAGCTCCACCTTTGATGCCCTC	360
p51B	301	CAGAACAGCGTCACGGCGCCCTCGCCCTACGCACAGCCCAGCTCCACCTTCGATGCTCTC	360
		*****	
mp51	361	TCTCCATCCCCTGCCATTCCCTCCAACACAGATTACCCGGGCCCCACACAGCTTCGATGTG	420
p51B	361	TCTCCATCACCCGCCATCCCCTCCAACACCGACTACCCAGGCCCGCACAGTTTCGACGTG	420
		*****	
mp51	421	TCCTTCCAGCAGTCAAGCACTGCCAAGTCAGCCACCTGGACGTATTCCACCGAAGTGAAG	480
p51B	421	TCCTTCCAGCAGTCGAGCACCGCCAAAGTCGGCCACCTGGACGTATTCCACTGAAGTGAAG	480
		*****	
mp51	481	AAGCTGTACTGCCAGATTGCGAAGACATGCCCCATCCAGATCAAGGTGATGACCCACCC	540
p51B	481	AACTCTACTGCCAATTGCAAAGACATGCCCCATCCAGATCAAGGTGATGACCCACCT	540
		**	
mp51	541	CCACAGGGCGCTGTTATCCGTGCCATGCCTGTCTACAAGAAAGCTGAGCATGTCACCGAG	600
p51B	541	CCTCAGGGAGCTGTTATCCGCGCCATGCCTGTCTACAAAAAGCTGAGCACGTCACGGAG	600
		**	
mp51	601	GTTGTGAAACGATGCCCTAACCATGAGCTGAGCCGTGAGTTCAATGAGGGACAGATTGCC	660
p51B	601	GTGGTGAAGCGGTGCCCAACCATGAGCTGAGCCGTGAATTCAACGAGGGACAGATTGCC	660
		**	
mp51	661	CCTCCCAGTCATCTGATTTCGAGTAGAAGGGAAACAGCCATGCCCAGTATGTAGAAGATCCT	720
p51B	661	CCTCCTAGTCATTTGATTTCGAGTAGAGGGAAACAGCCATGCCCAGTATGTAGAAGATCCC	720
		*****	
mp51	721	ATCACGGGAAGGCAGAGCGTGCTGGTCCCTTATGAGCCACCACAGGTTGGCACTGAATTC	780
p51B	721	ATCACAGGAAGACAGAGTGTGCTGGTACCTTATGAGCCACCCAGGTTGGCACTGAATTC	780
		*****	

**This Page Blank (uspto)**



13 / 15

## F I G. 13

mp51 781 ACAACAGTCCTGTACAATTTTCATGTGTAACAGCAGCTGCGTCGGAGGAATGAACAGACGT 840  
p51B 781 ACCACAGTCTTGTACAATTTTCATGTGTAACAGCAGTTGTGTTGGAGGGATGAACCGCCGT 840  
\*\* \*\*\*\*\* \*\*

mp51 841 CCAATTTTAATCATCGTTACTCTGGAAACCAGAGATGGGCAAGTCCTGGGCCGACGGTGC 900  
p51B 841 CCAATTTTAATCATTTGTTACTCTGGAAACCAGAGATGGGCAAGTCCTGGGCCGACGCTGC 900  
\*\*\*\*\*

mp51 901 TTTGAGGCCCGGATCTGTGCTTGCCCAGGAAGAGACCGGAAGGCAGATGAAGACAGCATC 960  
p51B 901 TTTGAGGCCCGGATCTGTGCTTGCCCAGGAAGAGACCGGAAGGCAGATGAAGATAGCATC 960  
\*\*\*\*\*

mp51 961 AGAAAGCAGCAAGTATCGGACAGCGCAAAGAACGGCGATGGTACGAAGCGCCCTTTCCGT 1020  
p51B 961 AGAAAGCAGCAAGTTTCGGACAGTACAAAGAACGGTGATGGTACGAAGCGCCCGTTTCGT 1020  
\*\*\*\*\*

mp51 1021 CAGAATACACACGGAAATCCAGATGACTTCCATCAAGAAACGGAGATCCCCAGATGATGAG 1080  
p51B 1021 CAGAACACACATGGTATCCAGATGACATCCATCAAGAAACGAAGATCCCCAGATGATGAA 1080  
\*\*\*\*\*

mp51 1081 CTGCTGTACCTACCAGTGAGAGGTCGTGAGACGTACGAGATGTTGCTGAAGATCAAAGAG 1140  
p51B 1081 CTGTTATACCTTACCAAGTGAGGGGCCGTGAGACTTATGAAATGCTGTTGAAGATCAAAGAG 1140  
\*\*\* \* \*\*

mp51 1141 TCACTGGAGCTCATGCAGTACCTCCCTCAGCACACGATCGAAACGTACAGGCAGCAGCAG 1200  
p51B 1141 TCCCTGGAACTCATGCAGTACCTTCCTCAGCACACAATTGAAACGTACAGGCAACAGCAA 1200  
\*\* \*\*\*\*\*

mp51 1201 CAGCAGCAGCACCAGCACCTACTTCAGAAACAGACCTCGATGCAGTCTCAGTCTTCATAT 1260  
p51B 1201 CAGCAGCAGCACCAGCACTTACTTCAGAAACAGACCTCAATACAGTCTCCATCTTCATAT 1260  
\*\*\*\*\*

mp51 1261 GGCAACAGTTCCCCACCTCTGAACAAAATGAACAGCATGAACAAGCTGCCTTCCGTGAGC 1320  
p51B 1261 GGTAACAGCTCCCCACCTCTGAACAAAATGAACAGCATGAACAAGCTGCCTTCTGTGAGC 1320  
\*\* \*\*\*\*\*

mp51 1321 CAGCTTATCAACCCACAGCAGCGCAATGCCCTCACTCCCACCACCATGCCTGAGGGCATG 1380  
p51B 1321 CAGCTTATCAACCCCTCAGCAGCGCAACGCCCTCACTCCTACAACCATTCCTGATGGCATG 1380  
\*\*\*\*\*

mp51 1381 GGAGCCAACATTCCCTATGATGGGCACTCACATGCCAATGGCTGGAGACATGAATGGACTC 1440  
p51B 1381 GGAGCCAACATTCCCATGATGGGCACCCACATGCCAATGGCTGGAGACATGAATGGACTC 1440  
\*\*\*\*\*

mp51 1441 AGCCCTACCCAGCTCTCCCTCCCTCCACTCTCCATGCCCTCCACCTCCCACTGCACCCCA 1500  
p51B 1441 AGCCCCACCCAGGCACTCCCTCCCGCACTCTCCATGCCATCCACCTCCCACTGCACACCC 1500  
\*\*\*\*\*

mp51 1501 CCACCGCCCTACCCACAGACTGCAGCATTGTCAGTTTCTTAGCAAGGTTGGGCTGCTCA 1560  
p51B 1501 CCACCTCCGTATCCACAGATTGCAGCATTGTCAGTTTCTTAGCGAGGTTGGGCTGTTCA 1560  
\*\*\*\*\*

*This Page Blank (uspto)*

## FIG. 14

mp51 1561 TCATGCCTGGACTATTTTCACGACCCAGGGGCTGACCACCATCTATCAGATTGAGCATTAC 1620  
p51B 1561 TCATGTCTGGACTATTTTCACGACCCAGGGGCTGACCACCATCTATCAGATTGAGCATTAC 1620  
\*\*\*\*\*

mp51 1621 TCCATGGATGATTTGGCAAGTCTGAAGATCCCTGAACAGTCCGACATGCCATCTGGAAG 1680  
p51B 1621 TCCATGGATGATCTGGCAAGTCTGAAAATCCCTGAGCAATTCGACATGCGATCTGGAAG 1680  
\*\*\*\*\*

mp51 1681 GGCATCCTGGACCACAGGCAGCTGCACGACTTCTCCTCACCTCCTCATCTCCTGAGGACC 1740  
p51B 1681 GGCATCCTGGACCACCGGCAGCTCCACGAATTCTCCTCCCCTTCTCATCTCCTGCGGACC 1740  
\*\*\*\*\*

mp51 1741 CCAAGTGGTGCCTCTACCGTCAGTGTGGGCTCCAGTGAGACCCGTTGTAACGTGTGATC 1800  
p51B 1741 CCAAGCAGTGCCTCTACAGTCAGTGTGGGCTCCAGTGAGACCCGGGCTGACCGTGTATT 1800  
\*\*\*\*\*

mp51 1801 GATGCCGTGCGCTTTACCCCTCCGCCAGACCATCTCTTTTCCACCCCGTGACGAGTGAAT 1860  
p51B 1801 GATGCTGTGCGATTACCCCTCCGCCAGACCATCTCTTTCCCACCCCGAGATGAGTGAAT 1860  
\*\*\*\*\*

mp51 1861 GATTTCAACTTTGACATGGATTCTCGTCGCAACAAGCAGCAGCGTATCAAAGAGGAAGGA 1920  
p51B 1861 GACTTCAACTTTGACATGGATGCTCGCCGCAATAAGCAACAGCGCATCAAAGAGGAGGGG 1920  
\*\*

mp51 1921 GAA 1923  
p51B 1921 GAG 1923  
\*\*

This Page Blank (uspto)

15 / 15

## FIG. 15

mp51BnAA	MSQSTQTSEFLSPEVFQHIWDFLSQPICSVQPIELNFVDEPSENGATNKIEISMDCIRMQ	60
p51B aa	MSQSTQTNEFLSPEVFQHIWDFLSQPICSVQPIDLNFVDEPSEDGATNKIEISMDCIRMQ	60
	*****	
mp51BnAA	DSDLSDPMWFPQYTNLGLLNSMDQQIQNGSSSTSPYNTDHAQNSVTAPSPYAQPSSTFDAL	120
p51B aa	DSDLSDPMWFPQYTNLGLLNSMDQQIQNGSSSTSPYNTDHAQNSVTAPSPYAQPSSTFDAL	120
	*****	
mp51BnAA	SPSPAIPSN TDYPGPHSFDVSFQSSSTAKSATWTYSTELKKLYCQIAKTCPIQIKVMTTP	180
p51B aa	SPSPAIPSN TDYPGPHSFDVSFQSSSTAKSATWTYSTELKKLYCQIAKTCPIQIKVMTTP	180
	*****	
mp51BnAA	PQGA VIRAMPVYKKAESHVTEVVKRCPNHEL SREFNEGQIAPP SHLIRVEGNSHAQYVEDP	240
p51B aa	PQGA VIRAMPVYKKAESHVTEVVKRCPNHEL SREFNEGQIAPP SHLIRVEGNSHAQYVEDP	240
	*****	
mp51BnAA	ITGRQSVLVPIEPPQVGTEFTTVLYNFM CNSSCVGGMNRRPILIIIVTLETRDGQVLGRRC	300
p51B aa	ITGRQSVLVPIEPPQVGTEFTTVLYNFM CNSSCVGGMNRRPILIIIVTLETRDGQVLGRRC	300
	*****	
mp51BnAA	FEARICACPGDRK ADEDSIRKQOVSDSAKNGDGTRPFRQNTHEGIQMTSIRKRRSPDDE	360
p51B aa	FEARICACPGDRK ADEDSIRKQOVSDSTKNGDGTRPFRQNTHEGIQMTSIRKRRSPDDE	360
	*****	
mp51BnAA	LLYLEPVRGRETYEMLLKIKESLELMQYLPQHTIETIYRQQQQQQHQHLLQKQTSMQSQSSY	420
p51B aa	LLYLEPVRGRETYEMLLKIKESLELMQYLPQHTIETIYRQQQQQQHQHLLQKQTSIQSPSSY	420
	*****	
mp51BnAA	GNSSPPLNKMNSMNKLPSVSQLINPQORNALTPPTTMEPGMGANIPMMGTHMPMAGDMNGL	480
p51B aa	GNSSPPLNKMNSMNKLPSVSQLINPQORNALTPPTTIPDGMGANIPMMGTHMPMAGDMNGL	480
	*****	
mp51BnAA	SPTQALPPPLSMPSTSHCTPPPPYP TDCSIVSFLARLGCSSCLDYFTTQGLTTIYQIEHY	540
p51B aa	SPTQALPPPLSMPSTSHCTPPPPYP TDCSIVSFLARLGCSSCLDYFTTQGLTTIYQIEHY	540
	*****	
mp51BnAA	SMDDLASLKIFEQFRHAIWK GILDRQLHDFSSPPHLLRTPSGASTVSVGSSETRGERVI	600
p51B aa	SMDDLASLKIFEQFRHAIWK GILDRQLHEFSSPSHLLRTPSSASTVSVGSSETRGERVI	600
	*****	
mp51BnAA	DAVRFTLRQTISFFPRDEW NDFNFDMD SRRNKQQRIRKEEGE	641
p51B aa	DAVRFTLRQTISFFPRDEW NDFNFDMD ARR NKQQRIRKEEGE	641
	*****	

This Page Blank (uspto)

## SEQUENCE LISTING

<110> Ikawa, Yoji  
Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd.

<120> Human p51 gene and its product

<130> P99-16

<140>

<141>

<150> JP P1998-100467

<151> 1998-03-27

<160> 23

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 448

<212> PRT

<213> Human

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1).. (59)

<223> transactivation domain

<220>

<221> DNA\_BIND

<222> (142).. (321)

<223> DNA binding domain

<220>

<221> DOMAIN

<222> (353).. (397)

<223> oligomerization domain

<400> 1

Met Ser Gln Ser Thr Gln Thr Asn Glu Phe Leu Ser Pro Glu Val Phe  
1 5 10 15

Gln His Ile Trp Asp Phe Leu Glu Gln Pro Ile Cys Ser Val Gln Pro  
20 25 30

Ile Asp Leu Asn Phe Val Asp Glu Pro Ser Glu Asp Gly Ala Thr Asn  
35 40 45

Lys Ile Glu Ile Ser Met Asp Cys Ile Arg Met Gln Asp Ser Asp Leu  
50 55 60

Ser Asp Pro Met Trp Pro Gln Tyr Thr Asn Leu Gly Leu Leu Asn Ser  
65 70 75 80

Met Asp Gln Gln Ile Gln Asn Gly Ser Ser Ser Thr Ser Pro Tyr Asn  
85 90 95

Thr Asp His Ala Gln Asn Ser Val Thr Ala Pro Ser Pro Tyr Ala Gln  
100 105 110

Pro Ser Ser Thr Phe Asp Ala Leu Ser Pro Ser Pro Ala Ile Pro Ser  
115 120 125

Asn Thr Asp Tyr Pro Gly Pro His Ser Phe Asp Val Ser Phe Gln Gln  
130 135 140

Ser Ser Thr Ala Lys Ser Ala Thr Trp Thr Tyr Ser Thr Glu Leu Lys  
145 150 155 160

Lys Leu Tyr Cys Gln Ile Ala Lys Thr Cys Pro Ile Gln Ile Lys Val  
165 170 175

Met Thr Pro Pro Pro Gln Gly Ala Val Ile Arg Ala Met Pro Val Tyr

This Page Blank (uspto)



180	185	190
Lys Lys Ala Glu His Val Thr Glu Val Val Lys Arg Cys Pro Asn His		
195	200	205
Glu Leu Ser Arg Glu Phe Asn Glu Gly Gln Ile Ala Pro Pro Ser His		
210	215	220
Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Ser His Ala Gln Tyr Val Glu Asp Pro		
225	230	235
Ile Thr Gly Arg Gln Ser Val Leu Val Pro Tyr Glu Pro Pro Gln Val		
245	250	255
Gly Thr Glu Phe Thr Thr Val Leu Tyr Asn Phe Met Cys Asn Ser Ser		
260	265	270
Cys Val Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Ile Ile Val Thr Leu		
275	280	285
Glu Thr Arg Asp Gly Gln Val Leu Gly Arg Arg Cys Phe Glu Ala Arg		
290	295	300
Ile Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Lys Ala Asp Glu Asp Ser Ile		
305	310	315
Arg Lys Gln Gln Val Ser Asp Ser Thr Lys Asn Gly Asp Gly Thr Lys		
325	330	335
Arg Pro Phe Arg Gln Asn Thr His Gly Ile Gln Met Thr Ser Ile Lys		
340	345	350
Lys Arg Arg Ser Pro Asp Asp Glu Leu Leu Tyr Leu Pro Val Arg Gly		
355	360	365
Arg Glu Thr Tyr Glu Met Leu Leu Lys Ile Lys Glu Ser Leu Glu Leu		
370	375	380
Met Gln Tyr Leu Pro Gln His Thr Ile Glu Thr Tyr Arg Gln Gln Gln		
385	390	395
Gln Gln Gln His Gln His Leu Leu Gln Lys His Leu Leu Ser Ala Cys		
405	410	415
Phe Arg Asn Glu Leu Val Glu Pro Arg Arg Glu Thr Pro Lys Gln Ser		
420	425	430
Asp Val Phe Phe Arg His Ser Lys Pro Pro Asn Arg Ser Val Tyr Pro		
435	440	445

<210> 2  
 <211> 2816  
 <212> DNA  
 <213> Human

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (145).. (1488)

<220>  
 <221> polyA\_signal  
 <222> (2786).. (2791)

<400> 2  
 tcgttgatat caaagacagt tgaaggaaat gaattttgaa acttcacggt gtgccaccct 60  
 acagtactgc cctgaccctt acatccagcg ttctgtagaa acccagctca tttctcttgg 120  
 aaagaaagtt attaccgata cacc atg tcc cag agc aca cag aca aat gaa 171  
 Met Ser Gln Ser Thr Gln Thr Asn Glu

*This Page Blank (uspto)*

3/15

	1	5	
ttc ctc agt cca gag gtt ttc cag cat atc tgg gat ttt ctg gaa cag	219		
Phe Leu Ser Pro Glu Val Phe Gln His Ile Trp Asp Phe Leu Glu Gln			
10 15 20 25			
cct ata tgt tca gtt cag ccc att gac ttg aac ttt gtg gat gaa cca	267		
Pro Ile Cys Ser Val Gln Pro Ile Asp Leu Asn Phe Val Asp Glu Pro			
30 35 40			
tca gaa gat ggt gcg aca aac aag att gag att agc atg gac tgt atc	315		
Ser Glu Asp Gly Ala Thr Asn Lys Ile Glu Ile Ser Met Asp Cys Ile			
45 50 55			
cgc atg cag gac tcg gac ctg agt gac ccc atg tgg cca cag tac acg	363		
Arg Met Gln Asp Ser Asp Leu Ser Asp Pro Met Trp Pro Gln Tyr Thr			
60 65 70			
aac ctg ggg ctc ctg aac agc atg gac cag cag att cag aac ggc tcc	411		
Asn Leu Gly Leu Leu Asn Ser Met Asp Gln Gln Ile Gln Asn Gly Ser			
75 80 85			
tcg tcc acc agt ccc tat aac aca gac cac gcg cag aac agc gtc acg	459		
Ser Ser Thr Ser Pro Tyr Asn Thr Asp His Ala Gln Asn Ser Val Thr			
90 95 100 105			
gcg ccc tcg ccc tac gca cag ccc agc tcc acc ttc gat gct ctc tct	507		
Ala Pro Ser Pro Tyr Ala Gln Pro Ser Ser Thr Phe Asp Ala Leu Ser			
110 115 120			
cca tca ccc gcc atc ccc tcc aac acc gac tac cca ggc ccg cac agt	555		
Pro Ser Pro Ala Ile Pro Ser Asn Thr Asp Tyr Pro Gly Pro His Ser			
125 130 135			
ttc gac gtg tcc ttc cag cag tcg agc acc gcc aag tcg gcc acc tgg	603		
Phe Asp Val Ser Phe Gln Gln Ser Ser Thr Ala Lys Ser Ala Thr Trp			
140 145 150			
acg tat tcc act gaa ctg aag aaa ctc tac tgc caa att gca aag aca	651		
Thr Tyr Ser Thr Glu Leu Lys Lys Leu Tyr Cys Gln Ile Ala Lys Thr			
155 160 165			
tgc ccc atc cag atc aag gtg atg acc cca cct cct cag gga gct gtt	699		
Cys Pro Ile Gln Ile Lys Val Met Thr Pro Pro Pro Gln Gly Ala Val			
170 175 180 185			
atc cgc gcc atg cct gtc tac aaa aaa gct gag cac gtc acg gag gtg	747		
Ile Arg Ala Met Pro Val Tyr Lys Lys Ala Glu His Val Thr Glu Val			
190 195 200			
gtg aag cgg tgc ccc aac cat gag ctg agc cgt gaa ttc aac gag gga	795		
Val Lys Arg Cys Pro Asn His Glu Leu Ser Arg Glu Phe Asn Glu Gly			
205 210 215			
cag att gcc cct cct agt cat ttg att cga gta gag ggg aac agc cat	843		
Gln Ile Ala Pro Pro Ser His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Ser His			
220 225 230			
gcc cag tat gta gaa gat ccc atc aca gga aga cag agt gtg ctg gta	891		
Ala Gln Tyr Val Glu Asp Pro Ile Thr Gly Arg Gln Ser Val Leu Val			
235 240 245			
cct tat gag cca ccc cag gtt ggc act gaa ttc acg aca gtc ttg tac	939		
Pro Tyr Glu Pro Pro Gln Val Gly Thr Glu Phe Thr Thr Val Leu Tyr			
250 255 260 265			
aat ttc atg tgt aac agc agt tgt gtt gga ggg atg aac cgc cgt cca	987		
Asn Phe Met Cys Asn Ser Ser Cys Val Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro			
270 275 280			
att tta atc att gtt act ctg gaa acc aga gat ggg caa gtc ctg ggc	1035		
Ile Leu Ile Ile Val Thr Leu Glu Thr Arg Asp Gly Gln Val Leu Gly			
285 290 295			

**This Page Blank (uspto)**

cga cgc tgc ttt gag gcc cgg atc tgt gct tgc cca gga aga gac agg 1083  
 Arg Arg Cys Phe Glu Ala Arg Ile Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg  
 300 305 310

aag cgc gat gaa gat agc atc aga aag cag caa gtt tgc gac agt aca 1131  
 Lys Ala Asp Glu Asp Ser Ile Arg Lys Gln Gln Val Ser Asp Ser Thr  
 315 320 325

aag aac ggt gat ggt acg aag cgc cgg ttt cgt cag aac aca cat ggt 1179  
 Lys Asn Gly Asp Gly Thr Lys Arg Pro Phe Arg Gln Asn Thr His Gly  
 330 335 340 345

atc cag atg aca tcc atc aag aaa cga aga tcc cca gat gat gaa ctg 1227  
 Ile Gln Met Thr Ser Ile Lys Lys Arg Arg Ser Pro Asp Asp Glu Leu  
 350 355 360

tta tac tta cca gtg agg ggc cgt gag act tat gaa atg ctg ttg aag 1275  
 Leu Tyr Leu Pro Val Arg Gly Arg Glu Thr Tyr Glu Met Leu Leu Lys  
 365 370 375

atc aaa gag tcc ctg gaa ctc atg cag tac ctt cct cag cac aca att 1323  
 Ile Lys Glu Ser Leu Glu Leu Met Gln Tyr Leu Pro Gln His Thr Ile  
 380 385 390

gaa acg tac agg caa cag caa cag cag cag cac cag cac tta ctt cag 1371  
 Glu Thr Tyr Arg Gln Gln Gln Gln Gln Gln His Gln His Leu Leu Gln  
 395 400 405

aaa cat ctc ctt tca gcc tgc ttc agg aat gag ctt gtg gag ccc cgg 1419  
 Lys His Leu Leu Ser Ala Cys Phe Arg Asn Glu Leu Val Glu Pro Arg  
 410 415 420 425

aga gaa act cca aaa caa tct gac gtc ttc ttt aga cat tcc aag ccc 1467  
 Arg Glu Thr Pro Lys Gln Ser Asp Val Phe Phe Arg His Ser Lys Pro  
 430 435 440

cca aac cga tca gtg tac cca tagagcccta tctctatatt ttaagtgtgt 1518  
 Pro Asn Arg Ser Val Tyr Pro  
 445

ggtgtgtatt tccatgtgta tatgtgagtg tgtgtgtgtg tatgtgtgtg cgtgtgtatc 1578  
 tagccctcat aaacaggact tgaagacact ttggctcaga gacccaactg ctcaaaggca 1638  
 caaagccact agtgagagaa tcttttgaag ggactcaaac ctttacaaga aaggatgttt 1698  
 tctgcagatt ttgtatcctt agaccggcca ttgggtgggtg aggaaccact gtgtttgtct 1758  
 gtgagcttgc ttgtgtttcc tgggagggag gggtcagggtg gggaaaaggg cattaatgtg 1818  
 tttattggaa cctttttctg tcttcttctg ttgtttttct aaaattcaca gggaagcttt 1878  
 tgagcaggtc tcaaacttaa gatgtctttt taagaaaagg agaaaaaagt tgttatgtgc 1938  
 tgtgcataag taagttgtag gtgactgaga gactcagtca gacccittta atgctggtca 1998  
 tgtaataata ttgcaagtag taagaaacga aggtgtcaag tgtactgctg ggcagcgagg 2058  
 tgatcattac caaaagtaat caactttgtg ggtggagagt tctttgtgag aacttgcat 2118  
 atttgtgtcc tccctcatg ttaggtaga acatttctta atgctgtgta cctgcctctg 2178  
 ccactgtatg ttggcatctg ttatgctaaa gtttttcttg tacatgaaac cctggaagac 2238  
 ctactacaaa aaaactgttg ttggccccc atagcagggtg aactcatttt gtgcttttaa 2298  
 tagaaagaca aatccacccc agtaatatig cctttacgta gttgtttacc attattcaaa 2358  
 gctcaaaata gaatttgaag cctcttcaca aaatctgtga ttaatttgc 2418  
 ttctatccct caagcctacc taccataaaa ccagccatat tactgatact gttcagtgc 2478  
 tttagccagg agacttacgt tttgagtaag tgagatcaa gcagacgtgt taaaatcagc 2538

**This Page Blank (uspto)**

actcctggac tggaaattaa agattgaaag ggtagactac ttttcttttt ttactcaaa 2598  
 agtttagaga atctctgttt ctttccatit taaaaacata ttttaagata atagcataaa 2658  
 gactttaaaa atgttccctcc cctccatctt cccacacca gtcaccagca ctgtattttc 2718  
 tgtcaccaag acaatgattt ctgttattg aggctgttgc tttgtggat gtgtgatttt 2778  
 aattttcaat aaacttttgc atcttggttt aaaagaaa 2816

<210> 3  
 <211> 448  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 3  
 Met Ser Gln Ser Thr Gln Thr Asn Glu Phe Leu Ser Pro Glu Val Phe  
 1 5 10 15  
 Gln His Ile Trp Asp Phe Leu Glu Gln Pro Ile Cys Ser Val Gln Pro  
 20 25 30  
 Ile Asp Leu Asn Phe Val Asp Glu Pro Ser Glu Asp Gly Ala Thr Asn  
 35 40 45  
 Lys Ile Glu Ile Ser Met Asp Cys Ile Arg Met Gln Asp Ser Asp Leu  
 50 55 60  
 Ser Asp Pro Met Trp Pro Gln Tyr Thr Asn Leu Gly Leu Leu Asn Ser  
 65 70 75 80  
 Met Asp Gln Gln Ile Gln Asn Gly Ser Ser Ser Thr Ser Pro Tyr Asn  
 85 90 95  
 Thr Asp His Ala Gln Asn Ser Val Thr Ala Pro Ser Pro Tyr Ala Gln  
 100 105 110  
 Pro Ser Ser Thr Phe Asp Ala Leu Ser Pro Ser Pro Ala Ile Pro Ser  
 115 120 125  
 Asn Thr Asp Tyr Pro Gly Pro His Ser Phe Asp Val Ser Phe Gln Gln  
 130 135 140  
 Ser Ser Thr Ala Lys Ser Ala Thr Trp Thr Tyr Ser Thr Glu Leu Lys  
 145 150 155 160  
 Lys Leu Tyr Cys Gln Ile Ala Lys Thr Cys Pro Ile Gln Ile Lys Val  
 165 170 175  
 Met Thr Pro Pro Pro Gln Gly Ala Val Ile Arg Ala Met Pro Val Tyr  
 180 185 190  
 Lys Lys Ala Glu His Val Thr Glu Val Val Lys Arg Cys Pro Asn His  
 195 200 205  
 Glu Leu Ser Arg Glu Phe Asn Glu Gly Gln Ile Ala Pro Pro Ser His  
 210 215 220  
 Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Ser His Ala Gln Tyr Val Glu Asp Pro  
 225 230 235 240  
 Ile Thr Gly Arg Gln Ser Val Leu Val Pro Tyr Glu Pro Pro Gln Val  
 245 250 255  
 Gly Thr Glu Phe Thr Thr Val Leu Tyr Asn Phe Met Cys Asn Ser Ser  
 260 265 270  
 Cys Val Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Ile Ile Val Thr Leu  
 275 280 285  
 Glu Thr Arg Asp Gly Gln Val Leu Gly Arg Arg Cys Phe Glu Ala Arg  
 290 295 300

This Page Blank (uspto)



6/15

Ile Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Lys Ala Asp Glu Asp Ser Ile  
 305 310 315 320  
 Arg Lys Gln Gln Val Ser Asp Ser Thr Lys Asn Gly Asp Gly Thr Lys  
 325 330 335  
 Arg Pro Phe Arg Gln Asn Thr His Gly Ile Gln Met Thr Ser Ile Lys  
 340 345 350  
 Lys Arg Arg Ser Pro Asp Asp Glu Leu Leu Tyr Leu Pro Val Arg Gly  
 355 360 365  
 Arg Glu Thr Tyr Glu Met Leu Leu Lys Ile Lys Glu Ser Leu Glu Leu  
 370 375 380  
 Met Gln Tyr Leu Pro Gln His Thr Ile Glu Thr Tyr Arg Gln Gln Gln  
 385 390 395 400  
 Gln Gln Gln His Gln His Leu Leu Gln Lys His Leu Leu Ser Ala Cys  
 405 410 415  
 Phe Arg Asn Glu Leu Val Glu Pro Arg Arg Glu Thr Pro Lys Gln Ser  
 420 425 430  
 Asp Val Phe Phe Arg His Ser Lys Pro Pro Asn Arg Ser Val Tyr Pro  
 435 440 445

<210> 4  
 <211> 641  
 <212> PRT  
 <213> Human

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (1).. (59)  
 <223> transactivation domain

<220>  
 <221> DNA\_BIND  
 <222> (142).. (321)  
 <223> DNA binding domain

<220>  
 <221> DOMAIN  
 <222> (353).. (397)  
 <223> oligomerization domain

<400> 4  
 Met Ser Gln Ser Thr Gln Thr Asn Glu Phe Leu Ser Pro Glu Val Phe  
 1 5 10 15  
 Gln His Ile Trp Asp Phe Leu Glu Gln Pro Ile Cys Ser Val Gln Pro  
 20 25 30  
 Ile Asp Leu Asn Phe Val Asp Glu Pro Ser Glu Asp Gly Ala Thr Asn  
 35 40 45  
 Lys Ile Glu Ile Ser Met Asp Cys Ile Arg Met Gln Asp Ser Asp Leu  
 50 55 60  
 Ser Asp Pro Met Trp Pro Gln Tyr Thr Asn Leu Gly Leu Leu Asn Ser  
 65 70 75 80  
 Met Asp Gln Gln Ile Gln Asn Gly Ser Ser Ser Thr Ser Pro Tyr Asn  
 85 90 95  
 Thr Asp His Ala Gln Asn Ser Val Thr Ala Pro Ser Pro Tyr Ala Gln  
 100 105 110  
 Pro Ser Ser Thr Phe Asp Ala Leu Ser Pro Ser Pro Ala Ile Pro Ser  
 115 120 125  
 Asn Thr Asp Tyr Pro Gly Pro His Ser Phe Asp Val Ser Phe Gln Gln

**This Page Blank (uspto)**

7/15

130	135	140
Ser Ser Thr Ala Lys	Ser Ala Thr Trp Thr Tyr	Ser Thr Glu Leu Lys
145	150	155
Lys Leu Tyr Cys Gln	Ile Ala Lys Thr Cys Pro	Ile Gln Ile Lys Val
165	170	175
Met Thr Pro Pro Pro	Gln Gly Ala Val Ile Arg	Ala Met Pro Val Tyr
180	185	190
Lys Lys Ala Glu His	Val Thr Glu Val Val Lys	Arg Cys Pro Asn His
195	200	205
Glu Leu Ser Arg Glu	Phe Asn Glu Gly Gln Ile	Ala Pro Pro Ser His
210	215	220
Leu Ile Arg Val Glu	Gly Asn Ser His Ala Gln	Tyr Val Glu Asp Pro
225	230	235
Ile Thr Gly Arg Gln	Ser Val Leu Val Pro Tyr	Glu Pro Pro Gln Val
245	250	255
Gly Thr Glu Phe Thr	Thr Val Leu Tyr Asn Phe	Met Cys Asn Ser Ser
260	265	270
Cys Val Gly Gly Met	Asn Arg Arg Pro Ile Leu	Ile Ile Val Thr Leu
275	280	285
Glu Thr Arg Asp Gly	Gln Val Leu Gly Arg Arg	Cys Phe Glu Ala Arg
290	295	300
Ile Cys Ala Cys Pro	Gly Arg Asp Arg Lys Ala	Asp Glu Asp Ser Ile
305	310	315
Arg Lys Gln Gln Val	Ser Asp Ser Thr Lys Asn	Gly Asp Gly Thr Lys
325	330	335
Arg Pro Phe Arg Gln	Asn Thr His Gly Ile Gln	Met Thr Ser Ile Lys
340	345	350
Lys Arg Arg Ser Pro	Asp Asp Glu Leu Leu Tyr	Leu Pro Val Arg Gly
355	360	365
Arg Glu Thr Tyr Glu	Met Leu Leu Lys Ile Lys	Glu Ser Leu Glu Leu
370	375	380
Met Gln Tyr Leu Pro	Gln His Thr Ile Glu Thr	Tyr Arg Gln Gln Gln
385	390	395
Gln Gln Gln His Gln	His Leu Leu Gln Lys Gln	Thr Ser Ile Gln Ser
405	410	415
Pro Ser Ser Tyr Gly	Asn Ser Ser Pro Pro	Leu Asn Lys Met Asn Ser
420	425	430
Met Asn Lys Leu Pro	Ser Val Ser Gln Leu Ile	Asn Pro Gln Gln Arg
435	440	445
Asn Ala Leu Thr Pro	Thr Thr Ile Pro Asp Gly	Met Gly Ala Asn Ile
450	455	460
Pro Met Met Gly Thr	His Met Pro Met Ala Gly	Asp Met Asn Gly Leu
465	470	475
Ser Pro Thr Gln Ala	Leu Pro Pro Pro Leu Ser	Met Pro Ser Thr Ser
485	490	495
His Cys Thr Pro Pro	Pro Pro Tyr Pro Thr	Asp Cys Ser Ile Val Ser
500	505	510
Phe Leu Ala Arg Leu	Gly Cys Ser Ser Cys	Leu Asp Tyr Phe Thr Thr
515	520	525

This Page Blank (uspto)

Gln Gly Leu Thr Thr Ile Tyr Gln Ile Glu His Tyr Ser Met Asp Asp  
 530 535 540  
 Leu Ala Ser Leu Lys Ile Pro Glu Gln Phe Arg His Ala Ile Trp Lys  
 545 550 555 560  
 Gly Ile Leu Asp His Arg Gln Leu His Glu Phe Ser Ser Pro Ser His  
 565 570 575  
 Leu Leu Arg Thr Pro Ser Ser Ala Ser Thr Val Ser Val Gly Ser Ser  
 580 585 590  
 Glu Thr Arg Gly Glu Arg Val Ile Asp Ala Val Arg Phe Thr Leu Arg  
 595 600 605  
 Gln Thr Ile Ser Phe Pro Pro Arg Asp Glu Trp Asn Asp Phe Asn Phe  
 610 615 620  
 Asp Met Asp Ala Arg Arg Asn Lys Gln Gln Arg Ile Lys Glu Glu Gly  
 625 630 635 640  
 Glu

<210> 5  
 <211> 2270  
 <212> DNA  
 <213> Human

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (145).. (2067)

<400> 5  
 tcgttgatat caaagacagt tgaaggaaat gaattttgaa acttcacggt gtgccaccct 60  
 acagtactgc cctgaccctt acatccagcg ttctgtagaa acccagctca ttctcttgg 120  
 aaagaaagtt attaccgatc cacc atg tcc cag agc aca cag aca aat gaa 171  
 Met Ser Gln Ser Thr Gln Thr Asn Glu  
 1 5  
 ttc ctc agt cca gag gtt ttc cag cat atc tgg gat ttt ctg gaa cag 219  
 Phe Leu Ser Pro Glu Val Phe Gln His Ile Trp Asp Phe Leu Glu Gln  
 10 15 20 25  
 cct ata tgt tca gtt cag ccc att gac ttg aac ttt gtg gat gaa cca 267  
 Pro Ile Cys Ser Val Gln Pro Ile Asp Leu Asn Phe Val Asp Glu Pro  
 30 35 40  
 tca gaa gat ggt gcg aca aac aag att gag att agc atg gac tgt atc 315  
 Ser Glu Asp Gly Ala Thr Asn Lys Ile Glu Ile Ser Met Asp Cys Ile  
 45 50 55  
 cgc atg cag gac tcg gac ctg agt gac ccc atg tgg cca cag tac acg 363  
 Arg Met Gln Asp Ser Asp Leu Ser Asp Pro Met Trp Pro Gln Tyr Thr  
 60 65 70  
 aac ctg ggg ctc ctg aac agc atg gac cag cag att cag aac ggc tcc 411  
 Asn Leu Gly Leu Leu Asn Ser Met Asp Gln Gln Ile Gln Asn Gly Ser  
 75 80 85  
 tcg tcc acc agt ccc tat aac aca gac cac gcg cag aac agc gtc acg 459  
 Ser Ser Thr Ser Pro Tyr Asn Thr Asp His Ala Gln Asn Ser Val Thr  
 90 95 100 105  
 gcg ccc tcg ccc tac gca cag ccc agc tcc acc ttc gat gct ctc tct 507  
 Ala Pro Ser Pro Tyr Ala Gln Pro Ser Ser Thr Phe Asp Ala Leu Ser  
 110 115 120  
 cca tca ccc gcc atc ccc tcc aac acc gac tac cca gcc ccg cac agt 555  
 Pro Ser Pro Ala Ile Pro Ser Asn Thr Asp Tyr Pro Gly Pro His Ser  
 125 130 135

This Page Blank (uspto)

ttc gac gtg tcc ttc cag cag tcc agc acc gcc aag tcc gcc acc tgg 603  
 Phe Asp Val Ser Phe Gln Gln Ser Ser Thr Ala Lys Ser Ala Thr Trp  
 140 145 150

acg tat tcc act gaa ctg aag aaa ctc tac tgc caa att gca aag aca 651  
 Thr Tyr Ser Thr Glu Leu Lys Lys Leu Tyr Cys Gln Ile Ala Lys Thr  
 155 160 165

tgc ccc atc cag atc aag gtg atg acc cca cct cct cag gga gct gtt 699  
 Cys Pro Ile Gln Ile Lys Val Met Thr Pro Pro Pro Gln Gly Ala Val  
 170 175 180 185

atc cgc gcc atg cct gtc tac aaa aaa gct gag cac gtc acg gag gtg 747  
 Ile Arg Ala Met Pro Val Tyr Lys Lys Ala Glu His Val Thr Glu Val  
 190 195 200

gtg aag cgg tgc ccc aac cat gag ctg agc cgt gaa ttc aac gag gga 795  
 Val Lys Arg Cys Pro Asn His Glu Leu Ser Arg Glu Phe Asn Glu Gly  
 205 210 215

cag att gcc cct cct agt cat ttg att cga gta gag ggg aac agc cat 843  
 Gln Ile Ala Pro Pro Ser His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Ser His  
 220 225 230

gcc cag tat gta gaa gat ccc atc aca gga aga cag agt gtg ctg gta 891  
 Ala Gln Tyr Val Glu Asp Pro Ile Thr Gly Arg Gln Ser Val Leu Val  
 235 240 245

cct tat gag cca ccc cag gtt ggc act gaa ttc acg aca gtc ttg tac 939  
 Pro Tyr Glu Pro Pro Gln Val Gly Thr Glu Phe Thr Thr Val Leu Tyr  
 250 255 260 265

aat ttc atg tgt aac agc agt tgt gtt gga ggg atg aac cgc cgt cca 987  
 Asn Phe Met Cys Asn Ser Ser Cys Val Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro  
 270 275 280

att tta atc att gtt act ctg gaa acc aga gat ggg caa gtc ctg ggc 1035  
 Ile Leu Ile Ile Val Thr Leu Glu Thr Arg Asp Gly Gln Val Leu Gly  
 285 290 295

cga cgc tgc ttt gag gcc cgg atc tgt gct tgc cca gga aga gac agg 1083  
 Arg Arg Cys Phe Glu Ala Arg Ile Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg  
 300 305 310

aag cgc gat gaa gat agc atc aga aag cag caa gtt tcc gac agt aca 1131  
 Lys Ala Asp Glu Asp Ser Ile Arg Lys Gln Gln Val Ser Asp Ser Thr  
 315 320 325

aag aac ggt gat ggt acg aag cgc ccg ttt cgt cag aac aca cat ggt 1179  
 Lys Asn Gly Asp Gly Thr Lys Arg Pro Phe Arg Gln Asn Thr His Gly  
 330 335 340 345

atc cag atg aca tcc atc aag aaa cga aga tcc cca gat gat gaa ctg 1227  
 Ile Gln Met Thr Ser Ile Lys Lys Arg Arg Ser Pro Asp Asp Glu Leu  
 350 355 360

tta tac tta cca gtg agg ggc cgt gag act tat gaa atg ctg ttg aag 1275  
 Leu Tyr Leu Pro Val Arg Gly Arg Glu Thr Tyr Glu Met Leu Leu Lys  
 365 370 375

atc aaa gag tcc ctg gaa ctc atg cag tac ctt cct cag cac aca att 1323  
 Ile Lys Glu Ser Leu Glu Leu Met Gln Tyr Leu Pro Gln His Thr Ile  
 380 385 390

gaa acg tac agg caa cag caa cag cag cag cac cag cac tta ctt cag 1371  
 Glu Thr Tyr Arg Gln Gln Gln Gln Gln His Gln His Leu Leu Gln  
 395 400 405

aaa cag acc tca ata cag tct cca tct tca tat ggt aac agc tcc cca 1419  
 Lys Gln Thr Ser Ile Gln Ser Pro Ser Ser Tyr Gly Asn Ser Ser Pro  
 410 415 420 425

cct ctg aac aaa atg aac agc atg aac aag ctg cct tct gtg agc cag 1467

**This Page Blank (uspto)**



10/15

Pro Leu Asn Lys Met Asn Ser Met Asn Lys Leu Pro Ser Val Ser Gln  
 430 435 440

ctt atc aac cct cag cag cgc aac gcc ctc act cct aca acc att cct 1515  
 Leu Ile Asn Pro Gln Gln Arg Asn Ala Leu Thr Pro Thr Thr Ile Pro  
 445 450 455

gat ggc atg gga gcc aac att ccc atg atg ggc acc cac atg cca atg 1563  
 Asp Gly Met Gly Ala Asn Ile Pro Met Met Gly Thr His Met Pro Met  
 460 465 470

gct gga gac atg aat gga ctc agc ccc acc cag gca ctc cct ccc cca 1611  
 Ala Gly Asp Met Asn Gly Leu Ser Pro Thr Gln Ala Leu Pro Pro Pro  
 475 480 485

ctc tcc atg cca tcc acc tcc cac tgc aca ccc cca cct ccg tat ccc 1659  
 Leu Ser Met Pro Ser Thr Ser His Cys Thr Pro Pro Pro Tyr Pro  
 490 495 500 505

aca gat tgc agc att gtc agt ttc tta gcg agg ttg ggc tgt tca tca 1707  
 Thr Asp Cys Ser Ile Val Ser Phe Leu Ala Arg Leu Gly Cys Ser Ser  
 510 515 520

tgt ctg gac tat ttc acg acc cag ggg ctg acc acc atc tat cag att 1755  
 Cys Leu Asp Tyr Phe Thr Thr Gln Gly Leu Thr Thr Ile Tyr Gln Ile  
 525 530 535

gag cat tac tcc atg gat gat ctg gca agt ctg aaa atc cct gag caa 1803  
 Glu His Tyr Ser Met Asp Asp Leu Ala Ser Leu Lys Ile Pro Glu Gln  
 540 545 550

ttt cga cat gcg atc tgg aag ggc atc ctg gac cac cgg cag ctc cac 1851  
 Phe Arg His Ala Ile Trp Lys Gly Ile Leu Asp His Arg Gln Leu His  
 555 560 565

gaa ttc tcc tcc cct tct cat ctc ctg cgg acc cca agc agt gcc tct 1899  
 Glu Phe Ser Ser Pro Ser His Leu Leu Arg Thr Pro Ser Ser Ala Ser  
 570 575 580 585

aca gtc agt gtg ggc tcc agt gag acc cgg ggt gag cgt gtt att gat 1947  
 Thr Val Ser Val Gly Ser Ser Glu Thr Arg Gly Glu Arg Val Ile Asp  
 590 595 600

gct gtg cga ttc acc ctc cgc cag acc atc tct ttc cca ccc cga gat 1995  
 Ala Val Arg Phe Thr Leu Arg Gln Thr Ile Ser Phe Pro Pro Arg Asp  
 605 610 615

gag tgg aat gac ttc aac ttt gac atg gat gct cgc cgc aat aag caa 2043  
 Glu Trp Asn Asp Phe Asn Phe Asp Met Asp Ala Arg Arg Asn Lys Gln  
 620 625 630

cag cgc atc aaa gag gag ggg gag tgagcctcac catgtgagct ctctctatcc 2097  
 Gln Arg Ile Lys Glu Glu Gly Glu  
 635 640

ctctcctaac tgccagcccc ctaaaagcac tcttgcttaa tcttcaaagc ctctccta 2157

gctctcccc ttcctcttgt ctgatttctt aggggaagga gaagtaagag gctacctctt 2217

acctaacatc tgacctggca tctaattctg attctggctt taagccttca aaa 2270

<210> 6  
 <211> 641  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 6  
 Met Ser Gln Ser Thr Gln Thr Asn Glu Phe Leu Ser Pro Glu Val Phe  
 1 5 10 15

Gln His Ile Trp Asp Phe Leu Glu Gln Pro Ile Cys Ser Val Gln Pro  
 20 25 30

This Page Blank (uspto)

11/15

Ile Asp Leu Asn Phe Val Asp Glu Pro Ser Glu Asp Gly Ala Thr Asn  
 35 40 45  
 Lys Ile Glu Ile Ser Met Asp Cys Ile Arg Met Gln Asp Ser Asp Leu  
 50 55 60  
 Ser Asp Pro Met Trp Pro Gln Tyr Thr Asn Leu Gly Leu Leu Asn Ser  
 65 70 75 80  
 Met Asp Gln Gln Ile Gln Asn Gly Ser Ser Ser Thr Ser Pro Tyr Asn  
 85 90 95  
 Thr Asp His Ala Gln Asn Ser Val Thr Ala Pro Ser Pro Tyr Ala Gln  
 100 105 110  
 Pro Ser Ser Thr Phe Asp Ala Leu Ser Pro Ser Pro Ala Ile Pro Ser  
 115 120 125  
 Asn Thr Asp Tyr Pro Gly Pro His Ser Phe Asp Val Ser Phe Gln Gln  
 130 135 140  
 Ser Ser Thr Ala Lys Ser Ala Thr Trp Thr Tyr Ser Thr Glu Leu Lys  
 145 150 155 160  
 Lys Leu Tyr Cys Gln Ile Ala Lys Thr Cys Pro Ile Gln Ile Lys Val  
 165 170 175  
 Met Thr Pro Pro Pro Gln Gly Ala Val Ile Arg Ala Met Pro Val Tyr  
 180 185 190  
 Lys Lys Ala Glu His Val Thr Glu Val Val Lys Arg Cys Pro Asn His  
 195 200 205  
 Glu Leu Ser Arg Glu Phe Asn Glu Gly Gln Ile Ala Pro Pro Ser His  
 210 215 220  
 Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Ser His Ala Gln Tyr Val Glu Asp Pro  
 225 230 235 240  
 Ile Thr Gly Arg Gln Ser Val Leu Val Pro Tyr Glu Pro Pro Gln Val  
 245 250 255  
 Gly Thr Glu Phe Thr Thr Val Leu Tyr Asn Phe Met Cys Asn Ser Ser  
 260 265 270  
 Cys Val Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Ile Ile Val Thr Leu  
 275 280 285  
 Glu Thr Arg Asp Gly Gln Val Leu Gly Arg Arg Cys Phe Glu Ala Arg  
 290 295 300  
 Ile Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Lys Ala Asp Glu Asp Ser Ile  
 305 310 315 320  
 Arg Lys Gln Gln Val Ser Asp Ser Thr Lys Asn Gly Asp Gly Thr Lys  
 325 330 335  
 Arg Pro Phe Arg Gln Asn Thr His Gly Ile Gln Met Thr Ser Ile Lys  
 340 345 350  
 Lys Arg Arg Ser Pro Asp Asp Glu Leu Leu Tyr Leu Pro Val Arg Gly  
 355 360 365  
 Arg Glu Thr Tyr Glu Met Leu Leu Lys Ile Lys Glu Ser Leu Glu Leu  
 370 375 380  
 Met Gln Tyr Leu Pro Gln His Thr Ile Glu Thr Tyr Arg Gln Gln Gln  
 385 390 395 400  
 Gln Gln Gln His Gln His Leu Leu Gln Lys Gln Thr Ser Ile Gln Ser  
 405 410 415  
 Pro Ser Ser Tyr Gly Asn Ser Ser Pro Pro Leu Asn Lys Met Asn Ser  
 420 425 430

This Page Blank (uspto)

12/15

Met Asn Lys Leu Pro Ser Val Ser Gln Leu Ile Asn Pro Gln Gln Arg  
 435 440 445  
 Asn Ala Leu Thr Pro Thr Thr Ile Pro Asp Gly Met Gly Ala Asn Ile  
 450 455 460  
 Pro Met Met Gly Thr His Met Pro Met Ala Gly Asp Met Asn Gly Leu  
 465 470 475 480  
 Ser Pro Thr Gln Ala Leu Pro Pro Pro Leu Ser Met Pro Ser Thr Ser  
 485 490 495  
 His Cys Thr Pro Pro Pro Tyr Pro Thr Asp Cys Ser Ile Val Ser  
 500 505 510  
 Phe Leu Ala Arg Leu Gly Cys Ser Ser Cys Leu Asp Tyr Phe Thr Thr  
 515 520 525  
 Gln Gly Leu Thr Thr Ile Tyr Gln Ile Glu His Tyr Ser Met Asp Asp  
 530 535 540  
 Leu Ala Ser Leu Lys Ile Pro Glu Gln Phe Arg His Ala Ile Trp Lys  
 545 550 555 560  
 Gly Ile Leu Asp His Arg Gln Leu His Glu Phe Ser Ser Pro Ser His  
 565 570 575  
 Leu Leu Arg Thr Pro Ser Ser Ala Ser Thr Val Ser Val Gly Ser Ser  
 580 585 590  
 Glu Thr Arg Gly Glu Arg Val Ile Asp Ala Val Arg Phe Thr Leu Arg  
 595 600 605  
 Gln Thr Ile Ser Phe Pro Pro Arg Asp Glu Trp Asn Asp Phe Asn Phe  
 610 615 620  
 Asp Met Asp Ala Arg Arg Asn Lys Gln Gln Arg Ile Lys Glu Glu Gly  
 625 630 635 640  
 Glu

<210> 7  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:p73-F1 sense  
 primer

<400> 7  
 tacgtgcacg taaagacacg ttgctcc

27

<210> 8  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:p73-R1  
 antisense primer

<400> 8  
 tgctgcacgt tgctccacgt ggacgtacg

29

<210> 9  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

*This Page Blank (uspto)*

13/15

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:p73-F2 sense primer

&lt;400&gt; 9

tacgtatact acgacgtgta cgtgaaggg

29

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:p73-R2 antisense primer

&lt;400&gt; 10

atgaactacg acgtacgacg tccacgtat

29

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:HA-labeled expression construct

&lt;400&gt; 11

atgtatccat atgatgttcc agattatgct

30

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:p51-F1 sense primer

&lt;400&gt; 12

aaagaaagtt attacccgatg

20

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:p51-R1 antisense primer

&lt;400&gt; 13

cgcgtggtct gtgttatagg

20

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:p51-F2 sense primer

&lt;400&gt; 14

catggaccag cagattcaga

20

This Page Blank (uspto)



<210> 15  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:p51-R2  
antisense primer

<400> 15  
catcaccttg atctggatg 19

<210> 16  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:p51-F3 sense  
primer

<400> 16  
ccacctggac gtattccact 20

<210> 17  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:p51-R3  
antisense primer

<400> 17  
tggctcataa ggtaccag 18

<210> 18  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:p51-F4 sense  
primer

<400> 18  
catgagctga gccgtgaat 19

<210> 19  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:p51-R4  
antisense primer

<400> 19  
tatcttcac cgccttcctg 20

<210> 20  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:p51-F5 sense  
primer

This Page Blank (uspto)

15/15

<400> 20  
atgaaccgcc gtccaatt

18

<210> 21  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:p51-R5  
antisense primer

<400> 21  
gtgctgagga aggtactgca

20

<210> 22  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:p51-F6 sense  
primer

<400> 22  
tgaagatcaa agagtccttg

20

<210> 23  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:p51-R6  
antisense primer

<400> 23  
ctagtggcctt tgtgcctttg

20

This Page Blank (uspto)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01512

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12N5/16, C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12N5/16, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 97/28186, A1 (SANOFI), 7 August, 1997 (07. 08. 97) & AU, 9717275, A & EP, 877758, A2 & FR, 2744455, A1	1-18
X	Gene Vol. 112 No. 2 (1992) C. Caron de Fromentel et al., "Rainbow trout p53: cDNA cloning and biochemical characterization" p.241-245	1-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
15 June, 1999 (15. 06. 99)Date of mailing of the international search report  
29 June, 1999 (29. 06. 99)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

his Page Blank (uspto)

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup>

C12N15/12, C07K14/47, C12N5/16, C12P21/02

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup>

C12N15/12, C07K14/47, C12N5/16, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 97/28186, A1 (SANOFI) 7.8月. 1997 (07.08.97) & AU, 9717275, A & EP, 877758, A2 & FR, 2744455, A1	1-18
X	Gene Vol. 112 No. 2 (1992) C. Caron de Fromentel et al. "Rainbow trout p53: cDNA cloning and biochemical character- ization" p. 241-245	1-18

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15.06.99

国際調査報告の発送日 29.06.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

This Page Blank (uspto)